Untersuchungen zur Konstanz der Mitochondrien-DNA und über die mitochondrialen Proteine genetisch bekannter Oenotheren

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
CHRISTOPH OTTMAR
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Untersuchungen zur Konstanz der Mitochondrien-DNA und über die mitochondrialen Proteine genetisch bekannter Oenotheren

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
CHRISTOPH OTTMAR
aus Stuttgart

1983

Tag der mündlichen Prüfung	17.11.1983
Dekan	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Prof. Dr. B. Schwemmle
2. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein ständiges Interesse und seine Ratschläge, sowie dafür, daß er mir die Grundlage für diese Arbeit, das notwendige Saatgut, zur Verfügung gestellt hat.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Prinzhaus und Herrn Dr. O. Spring für die guten Ratschläge und ihre ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn S. Lelke und Frau S. Görig danke ich für die Arbeit und Hilfe in Gewächshaus und Labor.

Frau U. Christner danke ich besonders für die sorgfältige Anzucht der Gewebekulturen und für die zeichnerische Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
bert.	berteriana
cp	Chloroplasten
CsCl	Caesiumchlorid
Cytopl.	Cytoplasma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung
IEF	Isoelektrische Focusierung
Kb	Kilobasenpaare
MG	Molekulargewicht
min.	Minuten
Mit.	Mitochondrien, Mitochondriom
mt	mitochondrial(e)
od.	odorata
Oe.	Oenothera
OD	optical density
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglycol
Plst.	Plastiden, Plastom
Prot.Nr.	Protokoll-Nummer
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunden
STE	Na-Tris-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminomethan-sulfonsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WM	Waschmedium
w/v	weight/volume

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	6
II.A. Material und Methoden zur Untersuchung der mitochondrialen DNA	6
II.A.1. Reagenzien und Lösungen	6
II.A.1.1. Reagenzien	6
II.A.1.2. Pufferlösungen	7
II.A.1.3. Medien für die Gewebekulturen von Oenothera	9
II.A.2. Versuchspflanzen	10
II.A.2.1. Blätter	10
II.A.2.1.1. Anzucht der Pflanzen	11
II.A.2.2. Gewebekulturen	11
II.A.3. Isolierung der Mitochondrien	11
II.A.4. Isolierung der mitochondrialen DNA	14
II.A.5. Reinigung der mitochondrialen DNA	14
II.A.6. Analyse mit Restriktionsenzymen	15
II.B. Material und Methoden zur Untersuchung der mitochondrialen Proteine	16
II.B.1. Reagenzien und Lösungen	16
II.B.1.1. Reagenzien	16
II.B.1.2. Pufferlösungen	17
II.B.2. Gewebekulturen	18
II.B.3. Isolierung der Mitochondrien	18
II.B.4. Gewinnung der mitochondrialen Proteine	19
II.B.5. Trennung der mitochondrialen Proteine durch eindimensionale SDS-PAA-Gelelektrophorese (1-D-PAGE)	19
II.B.6. Auftrennung der mitochondrialen Proteine durch zweidimensionale SDS-PAGE	20
II.B.6.1. Isoelektrische Focusierung (1. Dimension)	20
II.B.6.2. Auftrennung nach Molekulargewicht (2. Dimension)	21
II.B.7. Trennung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran	21
III. Ergebnisse	23
III.A. Ergebnisse der Untersuchungen der mtDNA	23
III.A.1. Bestimmung der Schwebedichte der mtDNA aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata	23
III.A.2. Restriktionsenzymanalyse der mtDNA aus Oenothera	25
III.A.3. Untersuchungen zur Konstanz der mtDNA	27

Seite

III.A.4. Vergleich der mtDNA unterschiedlicher Mitochondrien-Typen 28

III.B. Ergebnisse der Untersuchungen der mitochondrialen Proteine 38
III.B.1. Methodische Vorbemerkungen 38
III.B.2. Untersuchungen zur Konstanz der mt-Proteine 41
III.B.3. Untersuchungen der mt-Proteine mit der zweidimensionalen SDS-PAGE 41
III.B.4. Vergleich der Proteinzusammensetzung der äußeren und inneren Mitochondrienmembran 42

IV. Diskussion 49

V. Zusammenfassung 59

VI. Literaturverzeichnis 61

I. Einleitung

Kurze Zeit nachdem DeVries, Correns und Tschermak fast gleichzeitig die Mendelschen Regeln wiederentdeckt hatten, wurden von BAUR (1909) und CORRENS (1909) den Mendelschen Regeln widersprechende Ergebnisse von Kreuzungsversuchen verschiedener Pflanzen veröffentlicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse schlossen beide auf eine vom Zellkern unabhängige, plasmagebundene Vererbung.

Diese Hypothese konnte in den folgenden Jahrzehnten durch zahlreiche Kreuzungsversuche (Zusammenfassungen z. B. bei HAGEMANN 1964, JINKS 1967) bestätigt und präzisiert werden: So konnte neben einer cytoplasmatischen Vererbung eine an die Plastiden gebundene Vererbung festgestellt werden. Man definiert deshalb das Genom (Genotypus) als Gesamtheit aller Kerngene und stellt diesem das Plasmon (Plasmotypus), die Gesamtheit der extrachromosomalen Gene, gegenüber. Das Plasmon selbst wird als Summe des Plastoms (die plastidiären Gene) und des Cytoplasmons (alle cytoplasmatischen Gene, vor allem die der Mitochondrien) definiert (s. MICHAELIS 1962, SCHWEMMLE, B. 1962). Nachdem in Plastiden und Mitochondrien eine jeweils eigene DNA (LUCK und REICH 1964, CHUN et al. 1963) und ein eigenes Transcriptions- und Translationssystem gefunden wurde, ist es vor kurzer Zeit gelungen, die mtDNA des Menschen vollständig zu sequenzieren und deren Gene zu lokalisieren (ANDERSON et al. 1981).

Als besonders geeignete Versuchsobjekte für extrachromosomal-genetische Untersuchungen haben sich die einjährigen Oenotheren Oenothera berteriana und Oenothera odorata* und die aus ihnen gewonnenen Bastarde (SCHWEMMLE, J. 1938) erwiesen. Durch die besondere cytogenetische Gunst dieser Oenotheren, die Komplexheterozygotie, ist es möglich, sie durch

* Aufgrund der systematischen Bearbeitung der Gattung Oenothera, Sektion Oenothera (Onagraceae) von DIETRICH (1977), ist die Oenothera berteriana als die Oenothera villaricae und die Oenothera odorata als Oenothera picensis, sspec. picensis, einzuordnen.

Selbstung als erbkonstante, reine Linien gleicher genetischer Konstitution weiterzuziehen (CLELAND 1972). Die Chromosomen-Komplexe der Oenothera berteriana werden mit B und l, die der Oenothera odorata mit v und I bezeichnet. Infolge der Komplexheterozygotie können durch reziproke Kreuzung drei Bastardpaare gewonnen werden, die bei gleicher genetischer Kernkonstitution das Cytoplasma (und somit die Mitochondrien) und die Plastiden der einen respektive der anderen Elternart besitzen: das Bastardpaar mit den Chromosomen-Komplexen B und I bert. Cytoplasma und bert. Plastiden (Prot.Nr. 8) bzw. od. Cytoplasma und od. Plastiden (Prot.Nr. 9), dann das Paar, das die Chromosomen-Komplexe l und v mit bert. Cytoplasma und bert. Plastiden (Prot.Nr. 11) bzw. od. Cytoplasma und od. Plastiden (Prot.Nr. 12) besitzt sowie als drittes Paar das mit den Chromosomen-Komplexen B und v, bert. Cytoplasma und bert. Plastiden (Prot.Nr. 14). Bei der ebenfalls auftretenden l·I ist die Form mit od. Plastiden nicht lebensfähig.

Der konstante und gerichtete Einfluß des extrachromosomalen Erbgutes wurde mittlerweile bei diesen Oenotherenformen an vielen morphologischen Merkmalen und physiologischen Eigenschaften nachgewiesen: So sind z. B. die Blattform und die Rosettenbildung (SCHWEMMLE, J. 1938), die photoperiodische Blühreaktion (SCHWEMMLE, B. 1962), die circadiane Rhythmik der Blattbewegung (FREY und SCHWEMMLE, B. 1967), die Samenkeimung und die Chlorophyllsynthese (LANGEWELLPOTT 1970), die L-Phenyl-alanin-Ammonium-Lyase-(PAL)-Aktivität (HACHTEL 1972, HACHTEL und SCHWEMMLE, B. 1972), die phytochromabhängige Anthocyansynthese (CHRISTNER 1973) sowie die Atmungsaktivität und die Phospholipidzusammensetzung isolierter Mitochondrien (BENZ 1979) im Zusammenwirken mit dem Genom plasmonabhängig. In Arbeiten von ALT (1980) und ALT et al. (1982) an cp-DNA von Oenothera konnte durch Restriktionsenzymanalysen schließlich für Oenothera berteriana und Oenothera odorata unterschiedliche cp-DNA-Moleküle nachgewiesen werden. Für die cp-DNA konnte auch gezeigt werden, daß sich die cp-DNA weder unter dem Einfluß eines fremden Kerns noch unter dem

Einfluß eines fremden Cytoplasmons bzw. Plastoms verändert hat.

BRENNICKE (1979,1980) untersuchte die mtDNA von Oenothera berteriana aus Gewebekulturen, wobei das Hauptgewicht dieser Untersuchungen auf der physikalisch-chemischen Charakterisierung dieser mtDNA lag. Im Rahmen dieser Arbeit stellte BRENNICKE auch erste restriktionsanalytische Untersuchungen zur Konstanz der mtDNA der verwendeten Oenotheren an. Er konnte dabei nur die mtDNA der drei Oenotherenformen, die ihm damals als Gewebekulturen zur Verfügung standen - die Oenothera berteriana mit bert. Cytopl. und bert. Plst., die B·I mit bert. Cytopl. und bert. Plst., sowie die B·l mit od. Cytopl. und bert. Plst. - miteinander vergleichen und zeigen, daß die mtDNA der Oenothera berteriana mit bert. Cytopl. und bert. Plst. ein identisches Restriktionsmuster wie die B·I mit bert. Cytopl. und bert. Plst. aufweist, während sich die mtDNA der B·l mit od. Cytopl. und bert. Plst. von der mtDNA der beiden ersten Formen unterscheidet.

Diese Untersuchungen lieferten aber nur erste Hinweise in Bezug auf die Konstanz bzw. die Unterschiedlichkeit der mtDNA von Oenothera berteriana und Oenothera odorata.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die mtDNA möglichst vieler Oenotherenformen mit Hilfe der Restriktionsanalyse vergleichend zu untersuchen, um diese ersten Ergebnisse auszuweiten und so ein möglichst vollständiges Bild über die Konstanz und die Vererbung der mtDNA von Oenothera berteriana und Oenothera odorata zu erhalten. Für die Durchführung dieser Versuche wäre es vorteilhaft gewesen, Gewebekulturen verwenden zu können, da in kurzer Zeit große Zellmengen zur Verfügung stehen und ihre Aufarbeitung und Handhabung einfacher ist.

Bisher ist es aber noch nicht gelungen, alle Oenotherenformen in Gewebekulturen zu überführen, so daß es sich als notwendig erwies, mtDNA aus Blättern von Oenothera berteriana und Oenothera odorata zu isolieren. Bis jetzt sind nur wenige Erfahrungen über die Isolierung von mtDNA aus Blättern

veröffentlicht worden (KOLODNER und TEWARI 1972, VEDEL und MATHIEU 1982, FONTARNAU und HERNANDEZ-YAGO 1982), so daß es ein besonderes Ziel der vorliegenden Arbeit war, unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen die Methode der Isolierung von mtDNA aus Blättern von Oenothera auszuarbeiten.

Parallel zu den vergleichenden Restriktionsenzymanalysen der mtDNA aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata sollte die mtDNA aus Gewebekulturen und Blättern gleicher Formen restriktionsanalytisch gegenübergestellt werden. Außerdem sollten die von BRENNICKE (1979, 1980) für mtDNA aus Gewebekulturen von Oenothera berteriana angegebenen Werte der Schwebedichte und der Gesamtlänge mit denen der mtDNA aus Blättern verglichen werden.

Die Verhältnisse der mtDNA von Oenothera berteriana und Oenothera odorata sollten sich in den Genprodukten dieser DNAs widerspiegeln. Ausgehend von dieser Überlegung war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die mitochondrialen Proteine der Oenothera berteriana und der Oenothera odorata vergleichend zu untersuchen. Diese Untersuchungen waren auch deshalb von großer Bedeutung, weil z. B. Unterschiede in der mtDNA nicht unbedingt Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Mitochondrien zur Folge haben müssen, da es sich evtl. um nichtcodierende Sequenzen handeln könnte.
Hinweise dafür, daß die unterschiedlichen mtDNAs auch unterschiedliche Proteinzusammensetzungen nach sich ziehen, gaben Untersuchungen von OTTMAR (1979) über die spezifische Aktivität mehrerer Mitochondrienenzyme eines reziproken Bastardpaares von Oenothera. Dabei zeigten sich bei allen untersuchten Enzymen signifikante, gleiche und gerichtete Unterschiede in der spezifischen Aktivität.

Die Untersuchungen der mitochondrialen Proteine wurden mit Gewebekulturen durchgeführt, da ihre Verwendung eine einfache und gute Reinigung der mitochondrialen Proteine ermöglichten. Es wurden alle vier zur Zeit als Gewebekulturen zur Verfügung stehenden Oenotherenformen untersucht, ihre genetische Konstitution geht aus Tabelle 2 hervor.

BENZ (1979) fand bei der Untersuchung von Phospholipiden und Fettsäuren isolierter Mitoplasten und ihrer äußeren Membranen aus Oenothera, daß bei kerngenomgleichen Oenotheren mit unterschiedlichem Plasmon deutliche Unterschiede in der Phospholipidzusammensetzung der Mitoplasten auftraten, während die äußeren Membranen identische Zusammensetzungen aufwiesen. Dadurch war gezeigt, daß die äußere Membran ausschließlich kerncodiert, der Mitoplast aber sowohl kern- als auch mitochondrial codiert ist.

Sollte sich bei allen Formen bestätigen, daß die mtDNA konstant vererbt wird, so müssen auch die Proteine der Mitoplasten und der äußeren Membranen dieselben Verhältnisse wie die Phospholipide aufweisen: In Fortführung der Ergebnisse von BENZ müssen die Mitoplasten Unterschiede, die äußeren Membranen aber Übereinstimmung im Proteinmuster aufweisen. Die Untersuchung dieser Frage sollte am Ende der Versuche der vorliegenden Arbeit stehen.

II. Material und Methoden

II.A. Material und Methoden zur Untersuchung der mitochondrialen DNA

II.A.1. Reagenzien und Lösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Reagenzien und Lösungen verwendet.

II.A.1.1. Reagenzien

Boehringer GmbH, Mannheim
- Restriktionsenzyme Bam H I, Eco R I, Hind III
- DNA-Längenstandards II und III
- Desoxyribonuklease
- Ethidiumbromid

Merck, Darmstadt
- Caesiumchlorid, suprapur
- Saccharose für Dichtegradientenzentrifugation

Sigma, St. Louis, USA
- Agarose, Type II, Medium EEO
- Dithiothreiol (DTT)

Difco Labs, Detroit, USA
- Bacto Agar
- Nutrient Broth
- Casamino acids

Serva, Heidelberg
- Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)

Außer den hier aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Präparate der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

II.A.1.2. Pufferlösungen

Homogenisationsmedium für Blätter

300 mM Mannit; 5 mM EDTA; 10 mM KH_2PO_4; 5 mM $MgSO_4$; 50 mM TES;
4 mM Mercaptoethanol; 2 mM Octanol pH 7,6

Waschmedium (WM) für Blätter

300 mM Mannit; 5 mM $MgSO_4$; 5 mM TES; 10 mM KH_2PO_4 pH 7,4

Homogenisationsmedium für Gewebekulturen

300 mM Mannit; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM KH_2PO_4; 0,01 % Octanol;
4 mM Mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,4

Waschmedium für Gewebekulturen

300 mM Mannit; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM Tris
in Phosphatpuffer aus 10 mM K_2HPO_4 und
10 mM KH_2PO_4 pH 7,4

Lösungen für Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

20 % Saccharose (w/v)
44 % " "
51 % " "
jeweils in 3 mM Tris/3 mM Mes-Puffer pH 7,5

STE (Na-Tris-EDTA)

0,1 M NaCl; 50 mM Tris; 10 mM EDTA pH 8,5

DNAse-Puffer

300 mM Mannit; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM KH_2PO_4; 50 mM Tris pH 7,5

SDS

25 % Na-Dodecylsulfatlösung in aq. dest.

TE (Tris-EDTA)

1mM EDTA; 10 mM Tris pH 8,0

Elektrophoresepuffer

0,36 M Tris; 0,3 M NaH_2PO_4; 0,1 M EDTA pH 7,5

Ethidiumbromid-Stammlösung

5 mg/ml in TE-Puffer

Stopmix Bam H I

7 mM Urea; 50 % Saccharose; 0,1 mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % BSA; 5 % PEG pH 7,0

Stopmix Eco R I und Hind III

4 mM Urea; 50 mM EDTA; 50 % Saccharose; 0,1 % Bromphenolblau pH 7,0

II.A.1.3. Medien für die Gewebekultur von Oenothera

Medium A_o (nach NITSCH und NITSCH 1969)
Mengenangaben in mg/l aqua dest.

KNO_3	950,000
NH_4NO_3	720,000
$MgSO_4$	195,000
$CaCl_2$	220,000
KH_2PO_4	68,000
$MnSO_4$	11,200
H_3PO_4	10,000
$ZnSO_4$	10,000
Na_2MoO_4	0,250
$CuSO_4$	0,025
FeEDTA	40,000
Glycin	2,000
Pyridoxinhydrochlorid	0,500
Thiaminhydrochlorid	0,500
Biotin	0,050
Folsäure	0,500
meso-Inosit	100,000
Difco-Bacto-Agar	9 000,000
Saccharose	10 000,000

Medium A_6
wie Medium A_o, zusätzlich mit

Indolessigsäure	0,100
Saccharose	20 000,000
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	5,000
4-Chlorphenoxyessigsäure	1,000

II.A.2. Versuchspflanzen

II.A.2.1. Blätter

Für die Untersuchungen der mtDNA aus Blättern wurden etwa acht Wochen alte Pflanzen der in Tabelle 1 abgegebenen genetischen Konstitution verwendet.

Die Samen stammten aus Nachzuchten des Jahres 1973. Um die bei der Mitochondrienisolierung störende Stärke, Phenole und Gerbstoffe abzubauen, wurden die Pflanzen einen Tag vor der Ernte verdunkelt und kühlgestellt.

Tabelle 1. Genetische Konstitution der Versuchspflanzen*

Protokoll-Nr.	Chromosomen-Komplexe	Mitochondrien	Plastiden
1	B·1	bert.	bert.
Oenothera berteriana			
2	B·1	od.	bert.
3	v·I	od.	od.
Oenothera odorata			
8	B·I	bert.	bert.
9	B·I	od.	od.
11	1·v	bert.	bert.
12	1·v	od.	od.

* zur Herkunft der verschiedenen Formen s. SCHWEMMLE, J. (1938), SCHWEMMLE, B. (1962), HAGEMANN (1964)

II.A.2.1.1. Anzucht der Pflanzen

Die Samen wurden auf zwei Lagen Filterpapier (Schleicher und Schüll, "Gelbband") in Petrischalen zum Keimen gebracht. Die Keimlinge wurden nach 5 - 7 Tagen in Einheitserde (Typ T) pikiert und bei 20 - 22° C und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit im Licht-Dunkelwechsel gehalten (Versuchsgewächshaus, Zusatzlicht von 4 - 20 Uhr).

II.A.2.2. Gewebekulturen

Die Gewebekulturen von Oenothera wurden aus sterilisierten Antheren von Freilandpflanzen gezogen. Die Antheren wurden auf A_0-Medium ausgelegt, bei 24° C in 10 Stunden Licht und 14 Stunden Dunkelheit bildeten sich nach 4 - 6 Wochen haselnußgroße Kalli. Diese Kalli wurden nun in 300 ml Erlenmeyerkolben auf A_6-Medium überimpft. Durch Teilung und dreiwöchentliches Umsetzen können die Kalli beliebig vermehrt werden.

Für die Untersuchung der mtDNA in der vorliegenden Arbeit wurden Gewebekulturen der Oenothera berteriana mit bert. Mitochondrien (Prot.Nr. 1) und der l·v mit od. Mitochondrien (Prot.Nr. 9) verwendet. Ihre genetische Konstitution geht aus Tabelle 1 hervor.

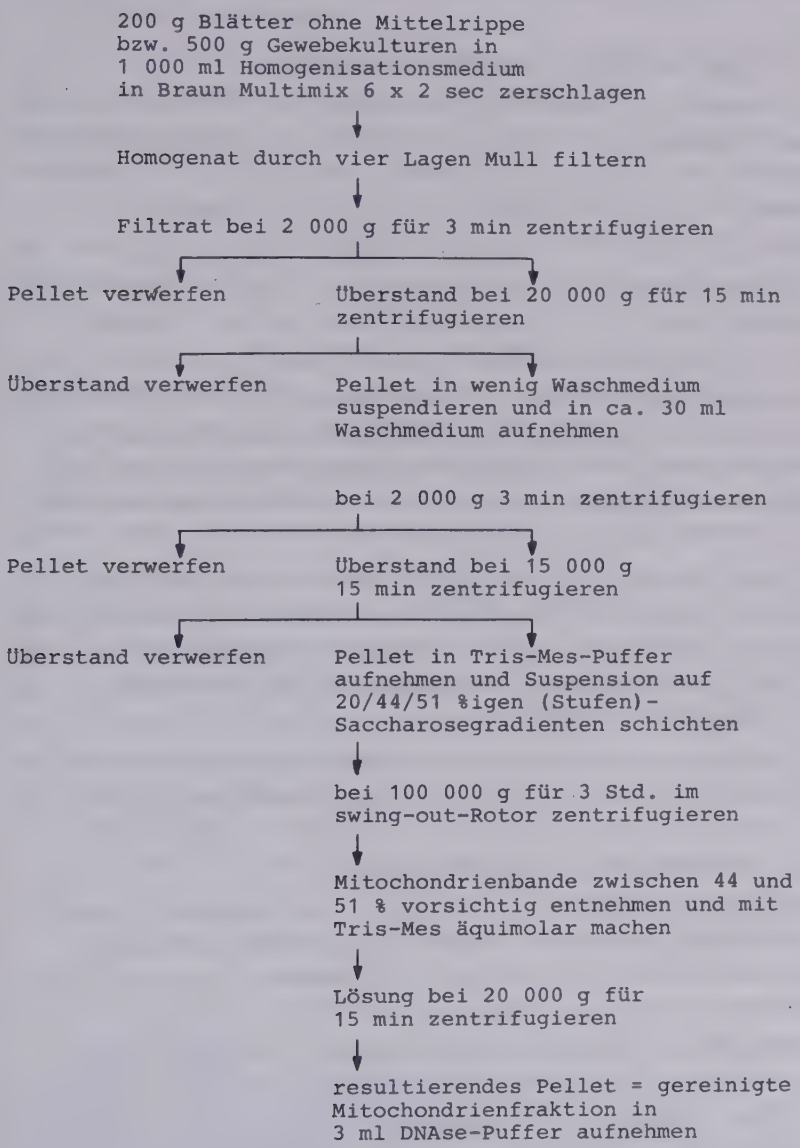
II.A.3. Isolierung der Mitochondrien

Zur Isolierung von Mitochondrien aus Blättern wurden die Blätter geerntet und mit Leitungswasser und anschließend mit aqua dest. gewaschen. Dann wurde die Mittelrippe entfernt, da hier besonders viele, den Erfolg der Mitochondrienisolierung gefährdende Stoffe enthalten sind. Für die Isolierung von Mitochondrien aus Blättern wurden 200 g Blätter ohne Mittelrippe verwendet.

Bei der Isolierung von Mitochondrien aus Gewebekulturen wurde der Inhalt von ca. 15 Kolben vereinigt, so daß 500 g Ausgangsmaterial erhalten wurden.

Die folgenden Schritte zur Isolierung von Mitochondrien waren für Blätter und Gewebekulturen identisch, die einzige Abweichung bestand in einem geringfügigen Unterschied bei der Zusammensetzung der Homogenisationsmedien (s. II.A.1.2.).

Flußdiagramm 1 zur Isolierung von Mitochondrien



Die Fraktionen der gereinigten Mitochondrien wurden durch geeignete Tests mit Markerenzymen identifiziert.

II.A.4. Isolierung der mitochondrialen DNA

Die Mitochondrien wurden nun eine Stunde bei 4° C mit 70 µg/ml DNAse I inkubiert, um anhaftende Kern- und Plastiden-DNA zu entfernen. Zur Entfernung der DNAse wurde 3mal mit Homogenisationsmedium gewaschen, dessen EDTA-Zusatz die DNAse durch Bindung der Mg^{2+}-Ionen das Enzym inhibiert.

Anschließend wurden die Mitochondrien in 3 ml STE suspendiert und durch Zugabe von 15 Tropfen 25 % SDS lysiert. Dadurch trat die mitochondriale DNA aus.

Festes CsCl wurde nun bis zu einer Dichte von ϱ = 1,7 (0,9 g CsCl/ml) hinzugegeben und durch kräftiges Schütteln gelöst. Dann wurde CsCl in TE zugegeben und EtBr (300 µg/ml) zur Anfärbung einpipettiert. Zum Tarieren wurde der Ansatz mit Paraffin überschichtet.

Dann wurde 70 - 90 Stunden bei 100 000 g im Beckmann-Rotor Typ 65 zentrifugiert. Im entstehenden Gradienten (von min 1,63 g/cm³ bis max 1,74 g/cm³) sammelte sich die mtDNA in der ihrer Dichte entsprechenden Zone und ist im UV-Licht als scharfe Bande erkennbar.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Inhalt eines Zentrifugenröhrchens in 0,5 ml-Fraktionen gesammelt.

II.A.5 Reinigung der mitochondrialen DNA

Um das EtBr zu entfernen, wurde jetzt jede Fraktion 3 - 4mal mit je 0,5 ml Isopropanol (gesättigt mit $CsCl/H_2O$) ausgeschüttelt und die Oberphase jeweils vorsichtig abgesaugt und verworfen.

Zur Entfernung des CsCl wurde die DNA in 70 % Ethanol bei -20° C für 8 Stunden gefällt. Sie wurde mit 12 000 g pelletiert und nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem Pelletieren wurde die DNA getrocknet und jede Probe in 0,5 ml TE aufgenommen.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration in der CsCl-freien Lösung bei 260 nm photometrisch bestimmt, wobei 1 OD 50 µg DNA/ml entsprechen.

Die Ausbeute an mitochondrialer DNA betrug etwa 100 µg DNA aus 200 g Blättern bzw. 500 g Kallusgewebe.

Die Schwebedichte der DNA wurde im Refraktometer bestimmt.

II.A.6. Analyse mit Restriktionsenzymen

Die restriktionsenzymatische Analyse der mitochondrialen DNA wurde jeweils in Puffersystemen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dabei wurden ca. 5 units Enzym pro µg mtDNA eingesetzt, als erster Schritt wurde ein Voransatz zur Bestimmung der reinsten mtDNA-Fraktion durchgeführt. Dies erwies sich als sinnvoll, da trotz DNAse-Inkubation noch mehr oder weniger große Restmengen an Kern-DNA in den einzelnen Proben nicht zu vermeiden waren (s. auch BRENNICKE 1979).

Für die Restriktionsanalyse der Hauptversuche wurden 5 µg mtDNA mit 20 - 30 units des jeweiligen Enzyms für 4 Stunden bei 37° C inkubiert.

Durch Fällung der Spaltstücke nach Zugabe von 3 M Na-acetat in 70 % Ethanol (8 Stunden bei -20° C) wurde das Enzym inhibiert und die Reassoziation der Spaltstücke verhindert. Zur besseren Befreiung von Salzen wurden die DNA-Fragmente noch einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl TE und 10 µl des jeweiligen Stopmix' aufgenommen.

Zur Trennung der DNA-Spaltstücke im 1 %igen Agarosegel wurde 1 g Agarose in 90 ml aqua dest. 5 - 10 min. gekocht. Dazu wurden dann 10 ml des 10fach konzentrierten Elektrophoresepuffers gegeben und das Gel zwischen zwei Plexiglasplatten mit 2 mm Spacer und -Kamm ausgegossen. Nach ca. 30 min. war das Gel erhärtet und die DNA-Proben wurden in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA für 15 min. gestartet und dann bei 50 mA für 3 - 4 Stunden fortgesetzt.

Als Elektrophoresepuffer diente 1fach konzentrierter Elektrophoresepuffer.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 15 min. lang in EtBr-Lösung gefärbt (3 µg EtBr/ml), dann im UV-Licht betrachtet und durch einen Rotfilter mit einer Polaroid-Land-Kamera oder einer Canon A1 fotografiert. Die Fragmentlängen der einzelnen DNA-Banden ließen sich anhand der Wanderungsgeschwindigkeiten zu den mitgewanderten λ-DNA-Markern (behandelt mit den Restriktionsenzymen Eco R I und Hind III) ermitteln.

II.B. Material und Methoden zur Untersuchung der mitochondrialen Proteine

II.B.1. Reagenzien und Lösungen

Für die Untersuchungen der mitochondrialen Proteine wurden folgende Reagenzien und Lösungen verwendet.

II.B.1.1. Reagenzien

Serva GmbH, Heidelberg
- Ampholyte pH 2 - 11, pH 7 - 9, pH 5 - 7
- Acrylamid, Bisacrylamid
- 2-Mercaptoethanol
- Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)
- Triton X-100
- Amberlite MB-6
- Coomassie-Blau G 250
- Temed

Pharmacia, Freiburg
- Eichkitt zur Molekulargewichtsbestimmung für Proteine (LMW)

Merck, Darmstadt
- Saccharose für Dichtegradientenzentrifugation

II.B.1.2. Pufferlösungen

Die Homogenisations- und Waschpuffer zur Isolierung von Mitochondrien aus Gewebekulturen sowie die Puffer zur Reinigung der Mitochondrien über einen Saccharose-Gradienten entsprechen den unter II.A.1.2. aufgeführten Puffern.

Fällung der Proteine

Isopropanol:Eisessig:Wasser im Verhältnis 5:2:3 (v/v/v)

Proben-Puffer für Proteine

10 mM Tris; 10 % SDS; 5 % Mercaptoethanol pH 8,5

Stammlösungen für Polyacrylamid(PAA)gele

a. 36,6 g Tris; 48 ml 1 N HCl; 0,23 ml Temed pH 8,9
b. 30 g Acrylamid; 0,8 g Bisacrylamid auf 100 ml aq. dest.
c. 150 mg Ammoniumpersulfat auf 100 ml aq. dest.
d. 200 mg SDS pro 100 ml Gelvolumen

Lösung für PAA-Rundgele zur isoelektrischen Focusierung

2,4 g Urea; 1 ml Triton X-100 10 %ig; 200 µl Ampholyte pH 2 - 11; 200 µl Ampholyte pH 9 - 7; 200 µl Ampholyte pH 7 - 5; 500 µl aq. dest.; 800 µl der 30 %igen Acrylamid-Stammlösung; 10 µl Temed; 10 µl Persulfat (10 %).

Elektrophorese-Puffer (10fach konzentriert)

0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS; 10 mM EDTA; 10 mM EGTA pH 8,3

SDS-Entfernung

10 % Eisessig; 25 % Isopropanol

Anfärbung

0,2 % Coomassie-Blau; 10 % Eisessig; 50 % Methanol

Entfärbung

10 % Eisessig; 5 % Methanol

Lösungen zur Probenbestimmung (nach LOWRY et al. 1951)

10 % Trichloressigsäure; 0,1 N NaOH; Folin-Reagenz (Merck Nr. 9001); Reaktionsgemisch aus: 4 g Na_2CO_3 in 90 ml aq. dest. + 2 ml Na-K-Tartrat (2 %) + 2 ml $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (1 %) + 6 ml aq. dest.

II.B.2. Gewebekulturen

Für die Untersuchungen der mitochondrialen Proteine wurden Gewebekulturen von in Tabelle 2 angegebenen Formen der Oenothera berteriana und der Formen B·I verwendet. Die Kulturbedingungen waren wie unter II.A.2.2. angegeben.

Tabelle 2. Genetische Konstitution der Versuchspflanzen

Protokoll-Nr.	Chromosomen-Komplexe	Mitochondrien	Plastiden
1	B·1	bert.	bert.
2	B·1	od.	bert.
8	B·I	bert.	bert.
9	B·I	od.	od.

II.B.3. Isolierung der Mitochondrien

Die Isolierung und Reinigung der Mitochondrien erfolgte wie unter II.A.3. dargestellt.

II.B.4. Gewinnung der mitochondrialen Proteine

Die gereinigten Mitochondrien wurden noch einmal bei 15 000 g pelletiert. Das Pellet wurde in einer Lösung aus Isopropanol: Eisessig:Wasser (5:2:3, v/v/v), pH < 1 sorgfältig suspendiert und die Lösung dann für 1 Stunde bei 4° C kaltgestellt. Zur Reinigung wurde dieser Schritt wiederholt. Die ausgefallenen Proteine wurden nun bei 18 000 g in 10 min. abzentrifugiert.

Das Pellet wurde durch mehrmaliges Spülen mit aqua dest. von den Resten der Isopropanol/Eisessig/Wasser-Lösung befreit und dann je nach Menge in 0,5 - 1,5 ml Proben-Puffer aufgenommen.

Dabei wurde ein pH von 8,5 eingestellt. Die Lösung wurde dann für 3 min. auf 100° C erhitzt, um eine optimale Wirkung des SDS zu gewährleisten. Nach Zentrifugation bei 10 000 g in 5 min. wurde der Überstand entweder sofort als Probe verwendet oder er wurde eingefroren. Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt.

II.B.5. Trennung der mitochondrialen Proteine durch eindimensionale SDS-PAA-Gelelektrophorese (1-D-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden Gele mit einem Gradienten von 10 - 15 % PAA verwendet.

Zu ihrer Herstellung wurden folgende Lösungen hergestellt und in einem Gradientenmischer gemixt (Lösungen a, b und c s. unter II.B.1.2.):

Trenngel:
10 %: 18 ml Lsg. a; 37 ml Lsg. b; 55 ml Lsg. c; 200 mg SDS
15 %: 18 ml Lsg. a; 60 ml Lsg. b; 32 ml Lsg. c; 200 mg SDS

Die Slabgele wurden mit den Maßen 14 x 18 x 2,7 cm gegossen und mit einem Trenngel zu ca. 3/4 gefüllt. Nach dessen Polymerisation wurde folgendes Sammelgel aufgebracht; in ihm wurden durch einen Kamm die Slots zum Auftrag der Proben ausgespart.

Sammelgel:

4 %: 5 ml Lsg. a; 6 ml Lsg. b; 30 ml Lsg. c; 80 mg SDS

Pro Slot wurden 50 µl = 0,2 mg Protein in Proben-Puffer aufgetragen; die Elektrophorese wurde bei 300 V und 250 mA in 2 - 3 Stunden durchgeführt. Anhand der mitgewanderten Markerproteine konnten die Molekulargewichte der präparierten Proteine festgestellt werden; Bromphenolblau diente als Frontmarker.

Danach wurde das SDS 30 min. lang durch transversale Elektrophorese entfernt (1 A/Gel; 12 V) und die Gele über Nacht in Coomassie-Lösung gefärbt. Am nächsten Morgen wurden die Gele durch transversale Elektrophorese entfärbt und anschließend fotografisch dokumentiert.

Zur längeren Fixierung wurden sie entweder in 10 % Eisessig aufbewahrt oder mit Hilfe eines Biorad-Geltrockners getrocknet.

II.B.6. Auftrennung der mitochondrialen Proteine durch zweidimensionale SDS-PAGE

Um die Unterschiede der Proteinzusammensetzung der beiden Mitochondrien-Typen genauer charakterisieren zu können, wurden einige Versuche mit Hilfe der 2-D-SDS-PAGE durchgeführt. Dabei wird in Erweiterung der 1-D-SDS-PAGE vor die Auftrennung nach Molekulargewichten noch eine Auftrennung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten vorangestellt.

II.B.6.1. Isoelektrische Focusierung (1. Dimension)

Zur Herstellung von Rundgelen für die isoelektrische Focusierung (IEF) wurden 5 Glasröhrchen mit den Maßen 6 x 140 mm unten mit Parafilm abgedichtet und mit einer Spritze vorsichtig mit je 1 ml der unter II.B.1.2. angegebenen Lösung bis ca. 2 cm unter den oberen Rand gefüllt. Um eine glatte Oberfläche zu erzielen, wurden die Gele sofort nach dem Gießen mit wenig 8 M Harnstoff überschichtet. Nach 2 - 3 Stunden Polymerisation konnten die Gele verwendet werden. Pro Rundgel wurden ca. 150 µl = 0,6 mg Protein in Proben-Puffer aufgetragen.

Zur IEF wurde an der Kathode 0,02 N NaOH und an der Anode 0,01 M H_3PO_4 verwendet. Die IEF wurde über Nacht bei 500 V durchgeführt; sie war beendet, wenn der Strom auf 0 mA gesunken war.

Am nächsten Morgen wurden die Gele vorsichtig aus den Glasröhrchen entfernt und 2 x 1 Stunde (Pufferwechsel) in Äquilibrierungspuffer zur Entfernung der Ampholyte bei Zimmertemperatur geschüttelt.

II.B.6.2. Auftrennung nach Molekulargewicht (2. Dimension)

Die Gele für die 2. Dimension entsprachen den unter II.B.5. beschriebenen Gelen mit der Ausnahme, daß anstelle des Sammelgels das Rundgel der IEF aufgebracht wurde. Dabei wurde das Rundgel in 1 % Agarose (in Äquilibrierungspuffer) auf dem Slabgel fixiert.

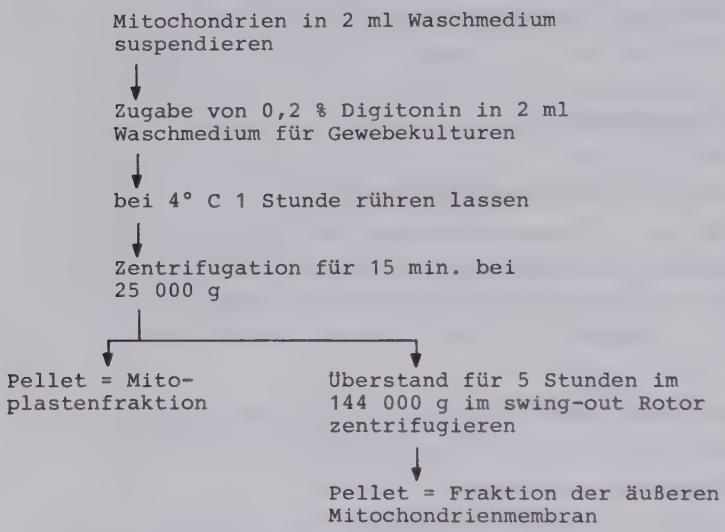
Die Elektrophorese wurde nun bei 250 V und 250 mA in ca. 3,5 Stunden durchgeführt; Bromphenolblau diente dabei als Frontmarker.

Auch hier wurden die Molekulargewichte der getrennten Proteine anhand mitgewanderter Marker identifiziert. Die Gele wurden zur SDS-Entfernung, Färbung und Entfärbung wie unter II.B.5. beschrieben behandelt.

II.B.7. Trennung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran

Zur Membrantrennung wurden die Mitochondrien wie unter II.A.3. isoliert. Die gereinigten Mitochondrien wurden pelletiert und folgendermaßen weiterbehandelt.

Flußdiagramm 2 zur Trennung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran



Die Proteine der Mitoplasten und der äußeren Mitochondrienmembranen wurden wie unter II.B.4. ausgefällt, gereinigt, aufgenommen und dann wie unter II.B.5. elektrophoretisch aufgetrennt.

III. Ergebnisse

III.A. Ergebnisse der Untersuchungen der mtDNA

In der Einleitung wurde dargelegt, daß bisher nur wenige Erfahrungen für die Isolierung von mtDNA aus Blättern vorliegen. Deshalb war ein großer Teil der Arbeit der Isolierung und Reinigung der mtDNA gewidmet. Im Laufe dieser methodischen Arbeiten konnten folgende methodische Verbesserungen erreicht werden.

Durch Lyse der Mitochondrien mit 25 % SDS nach der DNAse-Behandlung und durch längere Zentrifugation im CsCl-Gradienten konnte im Gegensatz zu früheren Angaben (KOLODNER und TEWARI 1972, LEBACQ und VEDEL 1981, FONTARNAU und HERNANDEZ-YAGO 1982) auf die Behandlung mit Proteinase und auf Chloroform-Phenol-Extraktion verzichtet werden. Außerdem zeigte es sich, daß anstelle von Dialysen oder Zentrifugationen über Nacht (KOLODNER und TEWARI 1972, LEBACQ und VEDEL 1981, FONTARNAU und HERNANDEZ-YAGO 1982) zur Entfernung der Salze mehrmaliges Waschen mit 70 % Ethanol bei -20° C zur Reinigung der mtDNA ausreichte. Durch diese Änderungen wurden adäquate Ergebnisse erreicht, die Isolierung der mtDNA konnte um drei Schritte reduziert werden. Damit war es möglich, die mtDNA schonender zu gewinnen, außerdem bedeutete diese Reduzierung auch einen geringeren Materialaufwand und geringere Kosten.

III.A.1. Bestimmung der Schwebedichte der mtDNA aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata

Die Schwebedichte der mtDNA wurde im Refraktometer bei 20° C bestimmt. Zum Vergleich mit den Ergebnissen von BRENNICKE (1979) und ALT (1980) wurde DNA aus Gradienten mit und ohne DNAse-Behandlung vor der Lyse der Mitochondrien untersucht. Dabei ergab sich folgendes Bild.

Die Schwebedichte der mtDNA der beiden Elternformen Oenothera berteriana und Oenothera odorata ist identisch und beträgt 1,71 g/cm^3.

In Gradienten, deren Mitochondrien vor ihrer Lyse mit DNAse behandelt wurden, lassen sich zwei DNA-haltige Banden durch Fluoreszenz des EtBr im UV ausmachen: Eine dünnere Bande mit einer Dichte von 1,703 g/cm³, und darunter eine Bande mit einer Dichte von 1,71 g/cm³. Die dünnere Bande enthält nichtabgebaute Reste der Kern-DNA und macht ca. 20 % der Präparation aus. Die weiter unten liegende Bande enthält die mtDNA mit 80 % der Präparation. Diese Ergebnisse stimmen mit den von HERMANN et al. (1975) und BRENNICKE (1979) gefundenen Werten überein.

Ohne vorherige DNAse-Behandlung sind, wie in Abb. 1 dargestellt, nach der Zentrifugation im Gradienten drei Banden sichtbar: Eine dünne, oberste Bande mit einer Schwebedichte von 1,698 g/cm³. Sie enthält die plastidiale DNA (ALT 1980). Darunter liegt dann sehr ausgeprägt die Bande der Kern-DNA (Dichte = 1,703 g/cm³), und als unterste Bande ist die mtDNA mit einer Dichte von 1,71 g/cm³ zu erkennen.

Diese drei unterschiedlichen DNA-Banden setzten sich mit zunehmender Zentrifugationsdauer (max. 90 Std.) immer deutlicher voneinander ab und lassen sich durch Fraktionierung dann gut voneinander trennen.

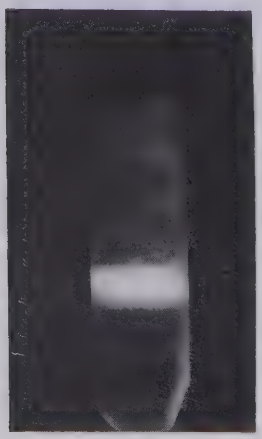


Abb. 1. CsCl-Gradient mit DNA aus Oenothera berteriana. 90 Std. Zentrifugation bei 100 000 g. Keine DNAse-Behandlung. Es sind von oben nach unten drei fluoreszierende helle Banden zu erkennen: Zuerst die cp-DNA, dann die kräftige Bande der Kern-DNA und darunter die mtDNA.

III.A.2. Restriktionsenzymanalyse der mtDNA aus Oenothera

Nach der Isolierung und Reinigung der mtDNA wurde sie mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt und die daraus resultierenden Spaltstücke auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei schnitten die verwendeten Restriktionsenzyme die mtDNA in 35 - 45 Fragmente; die unterschiedliche Anzahl der Fragmente ist durch die unterschiedlichen Erkennungssequenzen der einzelnen Enzyme zu erklären.

Die Größe der einzelnen Fragmente wurde aus Eichkurven von im gleichen Gel mitgewanderten Markermolekülen (λ-DNA mit den Restriktionsenzymen Eco R I und Hind III geschnitten) ermittelt. Abb. 2 zeigt ein Beispiel für eine solche Eichkurve.

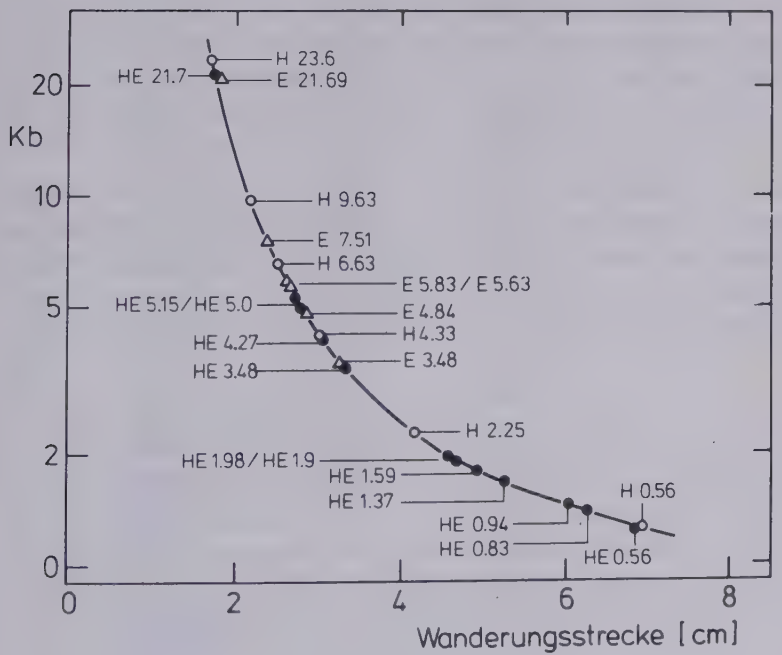


Abb. 2. Eichkurve der Eco R I/Hind III-Fragmente der DNA des Phagen λ . Für jedes Gel mußte eine neue Eichkurve erstellt werden, um die Größe der dort auftretenden DNA-Fragmente bestimmen zu können.

Tabelle 3. Restriktionsfragmentlängen von mtDNA aus Oenothera berteriana (Bam H I) und Oenothera odorata (Eco R I, Hind III). Die Fragmentlängen wurden aus jeweils vier verschiedenen Präparationen ermittelt*. (Die Längenangabe ist in Kilobasen zu verstehen.)

Fragment	Eco R I	Hind III	Bam H I
1	27,000	30,000	25,000
2	21,000	20,000	17,000
3	16,300	16,000	15,700
4	14,600	14,000	14,000
5	13,200	12,500	12,500
6	12,000	11,800	9,600
7	10,600	10,500	8,600
8	8,900	9,500	8,400
9	8,200	9,000	7,800
10	7,650	8,000	6,800
11	6,400	6,350	6,500
12	6,000	6,000	5,600
13	5,550	5,500	5,150
14	5,100	5,150	4,500
15	4,400	4,950	4,350
16	4,200	4,300	3,800
17	4,000	4,050	3,550
18	3,800	3,600	3,300
19	3,550	3,200	3,200
20	3,400	3,000	3,100
21	3,200	2,800	2,950
22	2,900	2,700	2,850
23	2,680	2,450	2,700
24	2,500	2,200	2,600
25	2,400	2,100	2,500
26	2,350	2,000	2,400
27	2,200	1,650	2,300
28	2,050	1,500	2,250
29	1,950	1,350	2,180
30	1,900	1,300	2,030
31	1,800	1,100	1,980
32	1,750	0,950	1,880
33	1,600	0,800	1,850
34	1,450	0,750	1,800
35	1,350		1,750
36	1,200		1,350
37	1,100		1,300
38	0,900		1,100
39	0,850		1,050
40	0,780		0,900
41	0,750		0,750
42	0,720		0,700
43			0,600
44			0,450
45			0,420
Gesamtlänge	208,430 Kb	211,050 Kb	211,090 Kb

* Ein Teil der Versuche wurde unter Mitarbeit von EICHER (1982) durchgeführt.

In Tabelle 3 (S. 26) sind die Fragmente aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata ihrer Größe nach dargestellt. Es zeigt sich dabei, daß die aus der Addition der Einzelfragmente errechnete Gesamtlänge der mtDNA von Oenothera berteriana und Oenothera odorata keine signifikanten Unterschiede aufweist. Die geringen Abweichungen haben ihre Ursache in unvermeidbaren Ableseungenauigkeiten (Tab. 3, S. 26).

Die aus den Restriktionsfragmenten errechnete Gesamtlänge der mtDNA aus Blättern von Oenotheren beträgt also 210 Kb.

Bei der Auswertung der Gele erschwerte die unterschiedliche Fluoreszenź der einzelnen Banden manchmal die Identifizierung. Diese Unterschiede sind auf verschieden starke Überlagerungen gleich großer Fragmente zurückzuführen. Dies läßt sich dadurch erklären, daß zwar pro Restriktionsansatz viele mt-Genome geschnitten werden, daß aber einige Erkennungssequenzen maskiert oder durch Bruch beschädigt sind. Diese Tatsache und der auch durch die DNAse-Behandlung nicht vermeidbare Rest an Kern-DNA in den Präparationen sind für den auf manchen Gelen zu sehenden nebligen Hintergrund verantwortlich.

Um bei den Untersuchungen der mtDNA die Ergebnisse abzusichern, wurden drei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet. Damit können Fehlinterpretationen, die bei Verwendung nur eines Restriktionsenzymes, das z. B. zufällig aufgrund seiner Erkennungssequenz unterschiedliche Bereiche erfaßt, vermieden werden.

III.A.3. Untersuchungen zur Konstanz der mtDNA

Wie in Tabelle 1 dargestellt, besitzen die Oenotherenformen der Protokoll-Nummern 1, 8 und 11 in Kombination mit unterschiedlichen Chromosomen-Komplexen die Mitochondrien des berteriana-Typs, die Oenotherenformen der Prot.Nr. 3, 9 und 12 besitzen dagegen die Mitochondrien des odorata-Typs.

Wie Abb. 3 zeigt, konnte anhand von restriktionsenzymatischen Analysen der mtDNA dieser Oenotherenformen nachgewiesen werden, daß die mtDNA der bert.-Mitochondrien unabhängig vom jeweiligen Kerngenom untereinander identisch sind; wie Abb. 4

deutlich macht, gilt dasselbe auch für die mtDNA der od.-Mitochondrien untereinander. In beiden Abbildungen ist die Identität der Spaltmuster der mtDNA der bert.-Mitochondrien einerseits (Abb. 3) und der mtDNA der od.-Mitochondrien andererseits (Abb. 4) gut zu erkennen.

Im Anschluß an die Untersuchungen zur Konstanz der jeweiligen mtDNA-Typen wurden Versuche durchgeführt, die die mtDNA aus Blättern mit der mtDNA aus Kallusgewebe derselben Protokoll-Nummer anhand von Restriktionsanalysen verglichen. Dabei wurde für die mtDNA der bert.-Mitochondrien Blätter und Kalli der Prot.Nr. 1, für die mtDNA der od.-Mitochondrien Blätter und Kalli der Prot.Nr. 9 verwendet.

Abb. 5 zeigt durch den Vergleich der Restriktionsfragmente deutlich, daß es zwischen der mtDNA aus Blättern und der mtDNA aus Gewebekulturen der gleichen Oenotherenformen keine Unterschiede gibt; während der nun schon 10 Jahre dauernden Anzucht der Gewebekulturen im Labor Prof. Schwemmles veränderte sich die mtDNA der Gewebekulturen gegenüber dem Ausgangsmaterial also nicht und steht uneingeschränkt für Untersuchungen zur Verfügung.

III.A.4. Vergleich der mtDNA unterschiedlicher Mitochondrien-Typen

In Erweiterung der Untersuchungen von BRENNICKE (1979, 1980) wurden als Abschluß der restriktionsenzymatischen Analysen die mtDNA der beiden Mitochondrien-Typen der Oenothera berriana und Oenothera odorata direkt miteinander verglichen. Durch Verwendung von Blättern als Ausgangsmaterial gelang es dabei zum erstenmal, die mtDNA der beiden Elternformen einander gegenüberzustellen. Die Abbildungen 6, 7 und 10 zeigen den Vergleich der Restriktionsfragmente der mtDNA aus Oenothera berteriana (Prot.Nr. 1) und Oenothera odorata (Prot.Nr. 3). In allen drei Abbildungen können Sequenzunterschiede der beiden mtDNA-Moleküle durch die unterschiedlichen Restriktionsmuster nachgewiesen werden.

Des weiteren wurde die mtDNA reziproker Bastardpaare, die bei gleichem kerngenetischem Hintergrund jeweils unterschiedliches Cytoplasmon besitzen (s. Tab. 1), restriktionsanalytisch untersucht. Wie Abb. 8 (reziprokes Bastardpaar B·I mit od. Cytopl. - Prot.Nr. 9 - bzw. bert. Cytopl. - Prot.Nr. 8 -) zeigt, lassen sich auch hier die beiden unterschiedlichen mtDNA-Moleküle anhand ihrer verschiedenen Restriktionsmuster voneinander abgrenzen. In Abb. 9 sind dieselben Verhältnisse auch für das reziproke Bastardpaar l·v mit bert. Cytopl. - Prot.Nr. 11 - bzw. od. Cytopl. - Prot.Nr. 12 - dargestellt.

Dabei konnten die von BRENNICKE (1979) an Gewebekulturen der Oenothera berteriana mit bert. Cytopl. (Prot.Nr. 1) und der Oenotherenform B·l mit od. Cytopl. (Prot.Nr. 2) gefundenen Ergebnisse bestätigt, wesentlich erweitert und vor allem am Ursprungsmaterial, den Pflanzen selbst, demonstriert werden: Die mtDNA der berteriana- und odorata-Mitochondrien unterscheidet sich bei der Analyse mit Restriktionsenzymen deutlich in ihrem Spaltmuster; es lassen sich also zwei unterschiedliche mtDNA-Moleküle voneinander abgrenzen.

Abb. 3. Restriktionsanalyse der mtDNA aus Oenotherenformen, welche bei verschieden zusammengesetzten Chromosomen-Komplexen aus beiden Elternformen alle berteriana-Mitochondrien enthalten. Alle drei Formen weisen dasselbe Restriktionsmuster auf. Verwendetes Restriktionsenzym: Eco R I. 1 % Agarose.

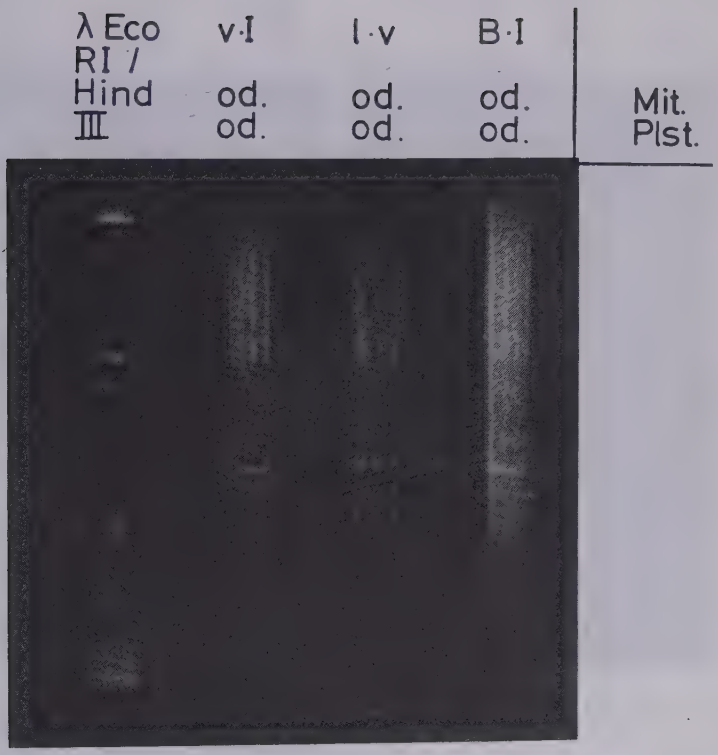


Abb. 4. Vergleich der Bam H I-Fragmente der mtDNA aus Oenotherenformen, welche bei verschieden zusammengesetzten Chromosomen-Komplexen aus beiden Elternformen alle odorata-Mitochondrien enthalten. Alle drei Formen zeigen dasselbe Restriktionsmuster.

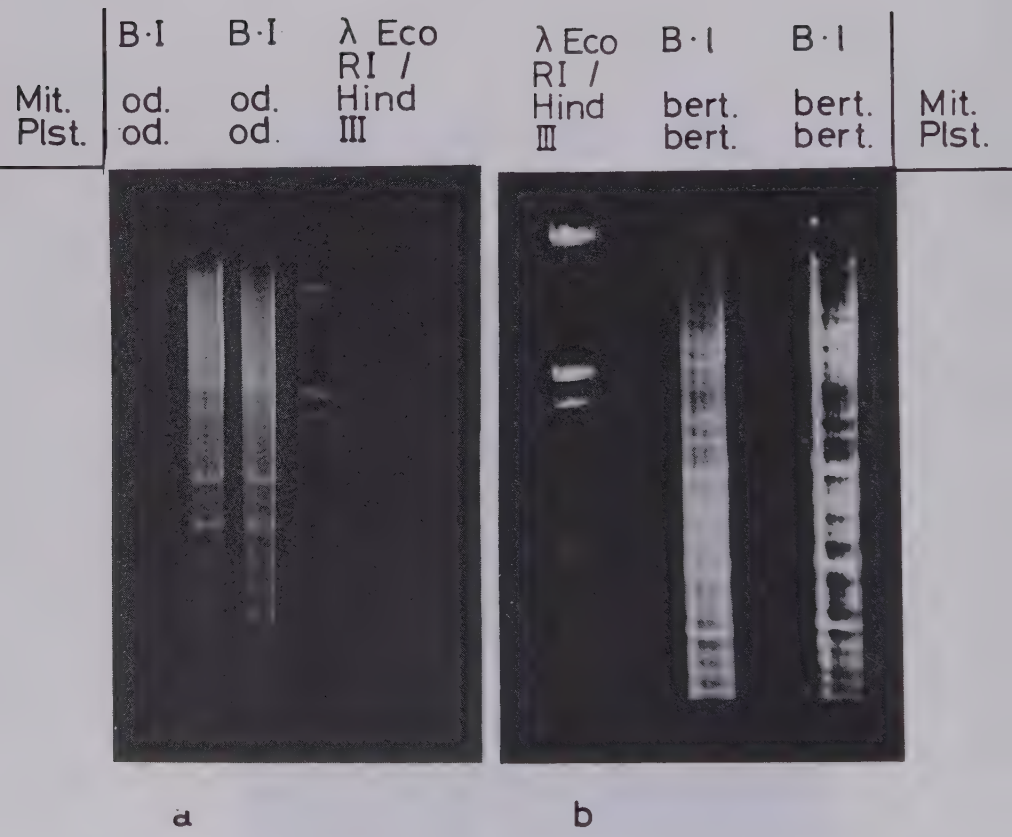


Abb. 5. Vergleich der Restriktionsfragmente von mtDNA aus Gewebekultur und Blättern.

a. Vergleich der mtDNA des Bastards B·I aus Blättern (links) mit mtDNA aus Gewebekulturen (Mitte) desselben Bastards. Verwendetes Restriktionsenzym: Bam H I.

b. Vergleich der mtDNA von Oenothera berteriana aus Blättern (rechts) mit mtDNA aus Gewebekulturen (Mitte) der Oenothera berteriana. Verwendetes Restriktionsenzym: Bam H I.

In beiden Fällen wird die Identität der mtDNA aus Blättern und Gewebekulturen aufgrund der identischen Spaltmuster deutlich.

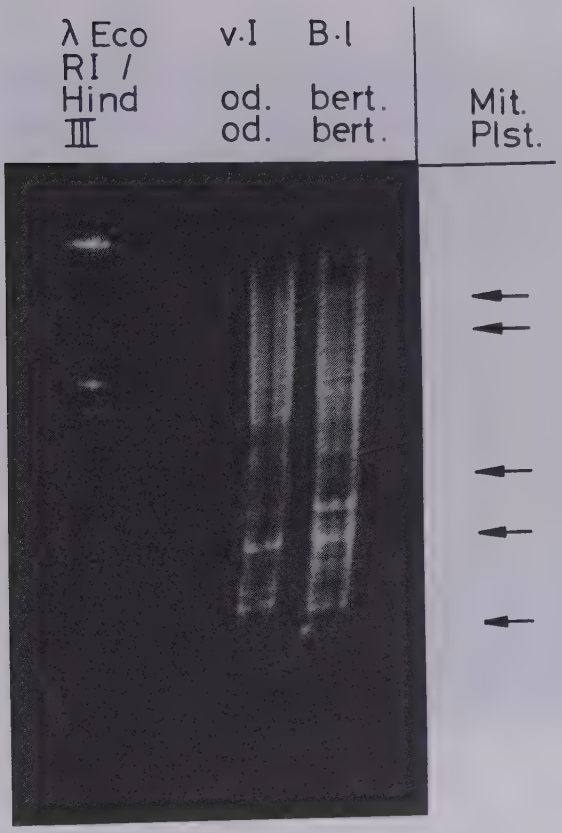


Abb. 6. Vergleich der Restriktionsfragmente der mtDNA der Elternformen Oenothera odorata (v·I) mit od. Cytopl. und der Oenothera berteriana (B·l) mit bert. Cytopl. Die bei den Elternformen unterschiedlichen Fragmente der mtDNA sind durch Pfeile gekennzeichnet. Verwendetes Restriktionsenzym: Bam H I. 0,95 % Agarose.

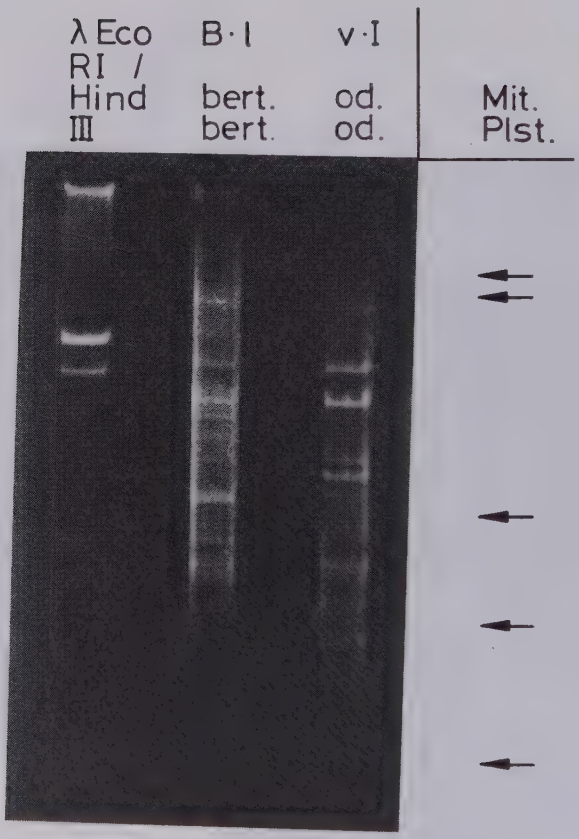


Abb. 7. Vergleich der Restriktionsfragmente der mtDNA der Oenothera berteriana (Prot.Nr. 1, Mitte) mit bert. Cytopl. und der Oenothera odorata (Prot.Nr. 3, rechts) mit od. Cytopl. Die bei den Elternformen unterschiedlichen Fragmente der mtDNA sind durch Pfeile gekennzeichnet.
Verwendetes Restriktionsenzym: Eco R I. 1 % Agarose.

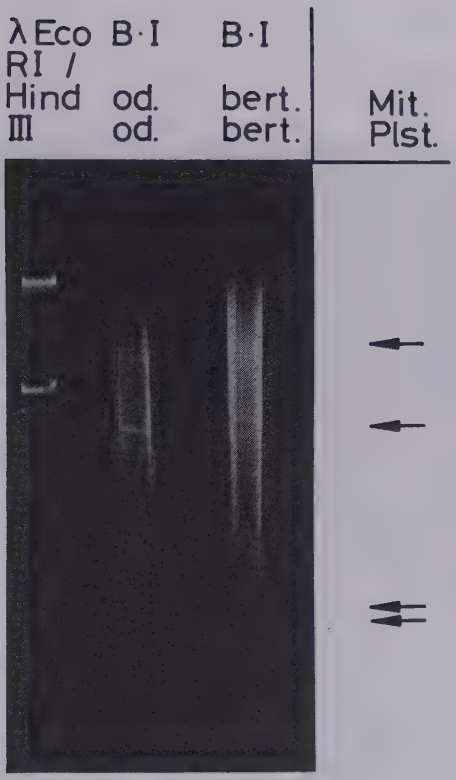


Abb. 8. Vergleich der Restriktionsfragmente der mtDNA der reziproken Bastarde B·I mit od. Cytopl. und od. Plst. (Prot.Nr. 9; Mitte) und B·I mit bert. Cytopl. und bert. Plst. (Prot.Nr. 8; rechts). Verwendetes Restriktionsenzym: Eco R I. 0,95 % Agarose. Die unterschiedlichen Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.

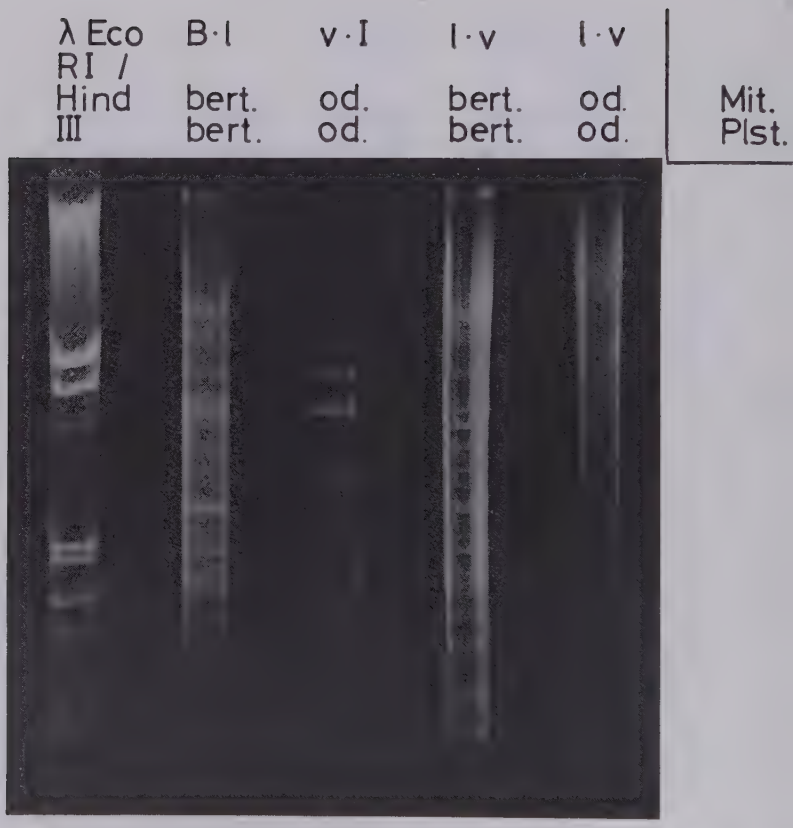


Abb. 9. Restriktionsanalyse der mtDNA aus Oenothera berteriana (B·l) mit bert. Cytopl. und Oenothera odorata (v·I) mit od. Cytopl. sowie des reziproken Bastardpaares l·v mit bert. Cytopl. und bert. Plst. (Prot. Nr. 11) und l·v mit od. Cytopl. und od. Plst. (Prot. Nr. 12).
Verwendetes Restriktionsenzym: Eco R I. 1 % Agarose. Die Unterschiede der mtDNA der B·l bert. Cytopl. und bert. Plst. zur v·I od. Cytopl. und od. Plst. sind deutlich zu sehen, ebenso die Unterschiede der mtDNA des reziproken Bastardpaares l·v bert. Cytopl. und bert. Plst. bzw. l·v od. Cytopl. und od. Plst.

Abb. 10. Restriktionsanalyse der mtDNA aus den Elternformen Oenothera odorata (v·I) und Oenothera berteriana (B·1) und einer Oenothera berteriana (B·1 od. Cytopl. und bert. Plst.), welche od.-Mitochondrien in Kombination mit bert.-Plastiden enthält. Verwendetes Restriktionsenzym: Bam H I. Die Fragmente, die die mtDNA der bert.-Mitochondrien von der der od.-Mitochondrien unterscheidet, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

III.B. Ergebnisse der Untersuchung der mitochondrialen Proteine

III.B.1. Methodische Vorbemerkungen

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Konstanz und die Unterschiedlichkeit der mtDNA auf der Ebene der sekundären Genprodukte, also der Proteine, widerspiegelt. Dazu wurde die Methode der ein- und zweidimensionalen Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen angewandt (LAEMMLI 1970, O'FARRELL 1975, O'FARRELL et al. 1977, CABRAL und SCHATZ 1979, DIANO 1982). Bevor hier aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten, mußten einige methodische Probleme gelöst werden.

Zunächst war es nötig, die beste Methode zur Extraktion der Proteine aus den isolierten und gereinigten Mitochondrien der verwendeten Oenotheren zu finden. Im Lauf der Versuche stellte es sich dabei heraus, daß eine Fällung der mitochondrialen Proteine mit einer Mischung aus Isopropanol, Eisessig und Wasser (5:2:3), pH< 1, bessere Ergebnisse als z. B. eine MeOH/$CHCl_3$-Fällung erbrachte, wie sie z. B. von ATTARDI und CHING (1979) und mehreren anderen Autoren durchgeführt wurde. Mehr als einmaliges Wiederholen der Fällung zur Reinigung führt nicht zu besseren Ergebnissen.

Ein weiteres Problem war die Aufnahme der gefällten Proteine in Proben-Puffer: Bei pH 8,5 lösten sich die Proteine erst ab einer SDS-Konzentration von 5 % aufwärts befriedigend im Puffer; als sehr gut erwies sich eine Endkonzentration von 8 % SDS. Aus 200 g Kallusgewebe wurden etwa 4 mg Protein präpariert.

Nach mehreren Versuchen zeigte es sich, daß ein lineares Gradientengel aus PAA von 10 - 15 % die besten Auftrennungen der untersuchten Proteine ergab. Mit der hier geschilderten Methode konnten knapp 50 Proteine als Banden in der eindimensionalen SDS-Elektrophorese dargestellt werden. Um das Molekulargewicht der elektrophoretisch getrennten Proteine bestimmen zu können, wurden käufliche Standards (LMW von Pharmacia) mit aufgetrennt. Abb. 11 zeigt eine Eichkurve dieser Marker-

proteine, aus der das Molekulargewicht jedes Proteins eines Gels ermittelt werden kann.

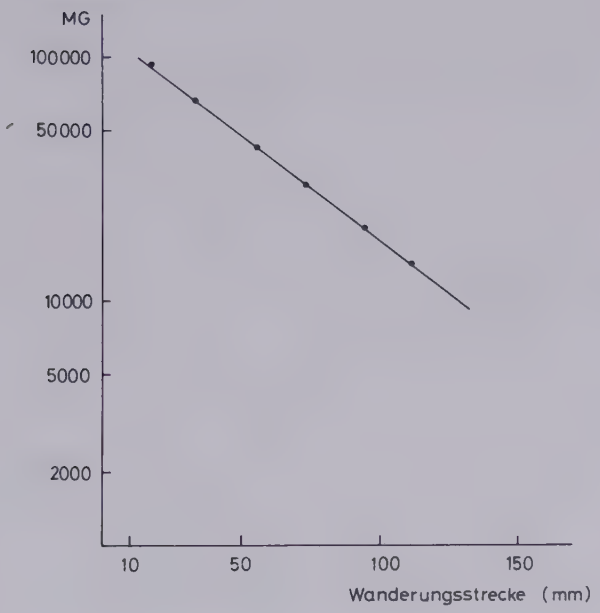


Abb. 11. Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen, aufgetrennt in 10 - 15 % PAA. Die Markerproteine sind nach Molekulargewicht aufgeführt: Phosphorylase b (94 000), Bovine serum albumin (67 000), Ovalbumin (43 000), carbonic anhydrase (30 000), soybean trypsin inhibitor (20 000) und α-Lactalbumin (14 400).

In zahlreichen Versuchen hat sich die unter II.B.4. beschriebene Zusammensetzung der Ampholyte für die IEF als für die durchgeführten Untersuchungen am besten geeignet erwiesen. Abb. 12 zeigt die pH-Verteilung eines IEF-Gels nach einem Lauf ohne Probe mit der am besten geeigneten Ampholyte-Verteilung, die vor allem den neutralen Bereich spreizt. Um diese pH-Verteilung messen zu können, wurde das Gel in 1 mm dicke Scheiben geschnitten, jede Scheibe wurde 1 Std. in 1 ml 0,1 M NaOH geschüttelt, anschließend wurde der pH gemessen.

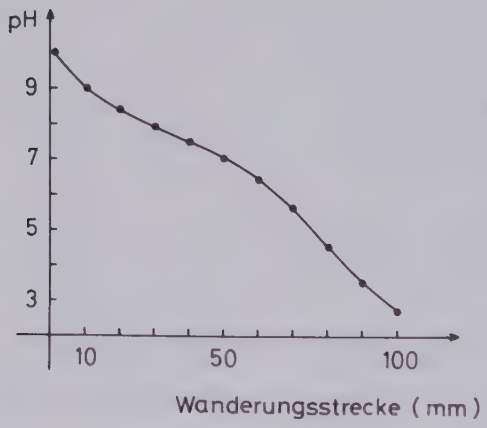


Abb. 12. pH-Verteilung eines IEF-Gels, wie sie für die 2-D-SDS-PAGE-Untersuchungen verwendet wurde.

Für die zweite Dimension erwies sich das unter II.B.5. dargestellte System, ebenfalls mit einem 10 - 15 %igen Gradienten als sehr geeignet. Hier lassen sich ca. 80 - 100 Proteine als Punkte erkennen.

III.B.2. Untersuchungen zur Konstanz der mt-Proteine

Bei diesen Untersuchungen wurden zuerst die mt-Proteine der berteriana-Mitochondrien (Prot.Nr. 1 und 8) sowie die der odorata-Mitochondrien (Prot.Nr. 2 und 9) analysiert. Wie die Abb. 13 und 14 zeigen, konnte auch hier entsprechend den bei der mtDNA gefundenen Ergebnissen gezeigt werden, daß die berteriana-Mitochondrien einerseits und die odorata-Mitochondrien andererseits untereinander identische Proteinmuster aufweisen.

Abb. 15 zeigt den direkten Vergleich der mt-Proteine des berteriana- und odorata-Typs. Wie aus den Proteinmustern zu erkennen ist, treten hier (wie das auch bei den Restriktionsmustern der entsprechenden mtDNAs der Fall ist) deutliche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der beiden Mitochondrientypen auf. In Abb. 16 werden die Proteinmuster der Mitochondrien aller vier verwendeten Oenotherenformen parallel dargestellt, auch hier sind die Identitäten zwischen jeweils gleichen Mitochondrien (Prot.Nr. 1 und 8 einerseits, Prot.Nr. 2 und 9 andererseits) gut zu erkennen, während die Unterschiede im Proteinmuster zwischen bert.- und od.-Mitochondrien ebenfalls klar zutage treten. Die Unterschiedlichkeit der mtDNAs setzt sich hier also im Bereich physiologisch wirksamer Genprodukte fort.

Die Unterschiede finden sich bei mehreren Banden, dabei treten folgende Proteine nur bei den bert.-Mitochondrien auf (Angaben in MG): 27 000, 18 300, 17 500. Folgende treten nur bei od.-Mitochondrien auf: 35 000, 28 500, 25 600 und 10 900.

III.B.3. Untersuchungen der mt-Proteine mit der zweidimensionalen SDS-PAGE

Um die Unterschiede im Proteinmuster der beiden Mitochondrientypen näher charakterisieren zu können, wurden Versuche mit der 2-D-PAGE durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß Proteine bzw. deren Untereinheiten anhand von zwei Parametern (isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht) beschrieben und so durch Vergleiche mit einiger Wahrscheinlichkeit charakterisiert werden können. Wie in Abb. 17 zu erkennen, treten auch

bei Anwendung dieser Methode deutliche Unterschiede im Proteinmuster der beiden untersuchten Mitochondrientypen zutage. Dies ist an der unterschiedlichen Position einiger im Gel als Punkte sichtbaren Proteine gut festzustellen.

III.B.4. Vergleich der Proteinzusammensetzung der äußeren und inneren Mitochondrienmembran

Bei der Untersuchung der Proteinzusammensetzung der äußeren Mitochondrienmembran und des Mitoplasten der beiden Mitochondrientypen konnte gezeigt werden, daß bei gleichem Kerngenom die Unterschiede in der Proteinzusammensetzung ausschließlich auf den Mitoplasten beschränkt sind, während die Proteinzusammensetzung der äußeren Membranen identisch ist. Dies zeigt die Abb. 18 sehr deutlich: Während in Abb. 18 b die Identität der Proteinmuster der äußeren Membranen demonstriert wird, läßt sich aus Abb. 18 a gut ersehen, daß die Mitoplasten der beiden untersuchten Oenotherenformen in ihrem Proteinmuster mehrere Unterschiede aufweisen.

Diese Ergebnisse ergänzen die von BENZ (1979) durchgeführten Versuche, der bei Untersuchungen der Phospholipide der Mitoplasten und der äußeren Membranen derselben Mitochondrientypen zu identischen Ergebnissen kam.

Diese Ergebnisse stehen mit der Endosymbiontenhypothese (Zusammenfassung bei SCHWEMMLER 1977) in Einklang, nach der die Bestandteile der äußeren Mitochondrienmembran ausschließlich kerncodiert sind, der Mitoplast aber sowohl vom mitochondrialen Genom als auch vom Kerngenom codiert ist.

Abb. 13. Vergleich der Proteinmuster der Mitochondrien aus zwei Oenotherenformen, die bei verschieden zusammengesetzten Chromosomen-Komplexen jeweils bert.-Mitochondrien enthalten (Prot.Nr. 1 und 8). In den zwei rechten Spuren ist die Identität im Proteinmuster gut zu erkennen, die zwei linken Spuren zeigen einen Parallelversuch der gleichen Formen, bei dem größere Mengen an Protein aufgetragen wurden. Daraus resultierte eine schlechtere Trennung in der oberen Hälfte des Gels.

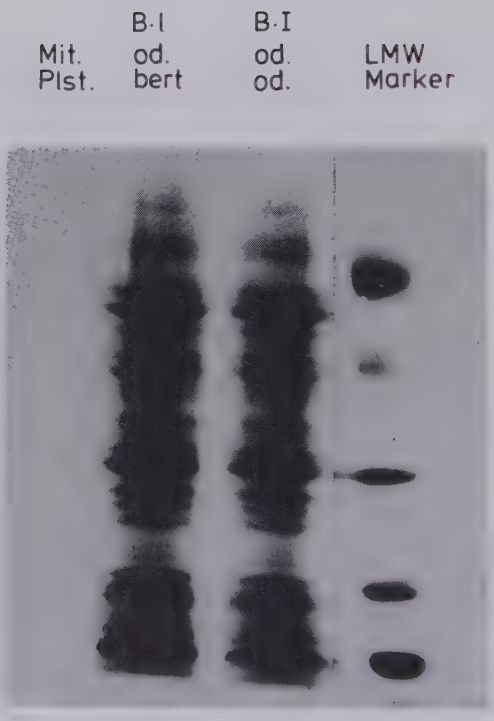


Abb. 14. Vergleich der Proteinmuster aus zwei Oenotherenformen, die bei verschieden zusammengesetzten Chromosomen-Komplexen jeweils od.-Mitochondrien enthalten (Prot.Nr. 2 und 9). Auch hier ist die Identität des Bandenmusters und damit der Proteinzusammensetzung gut zu sehen.

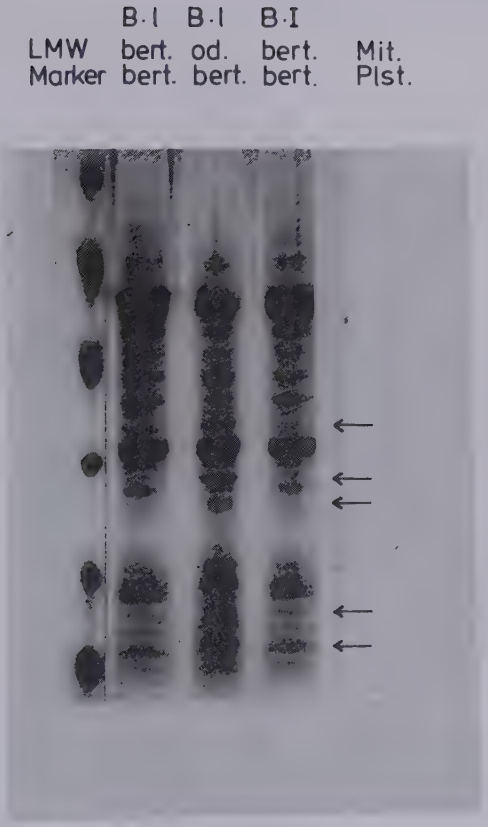


Abb. 15. Mitochondriales Proteinmuster der Oenothera berteriana (B·1) mit bert. Cytopl. und bert. Plst., der Oenotherenform B·1 mit od. Cytopl. und bert. Plst. sowie der Oenotherenform B·I mit bert. Cytopl. und bert. Plst.
Die Konstanz der bert.-Mitochondrien (äußere Reihen) untereinander ist gut zu sehen; die Unterschiede zu od.-Mitochondrien (mittlere Reihe) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

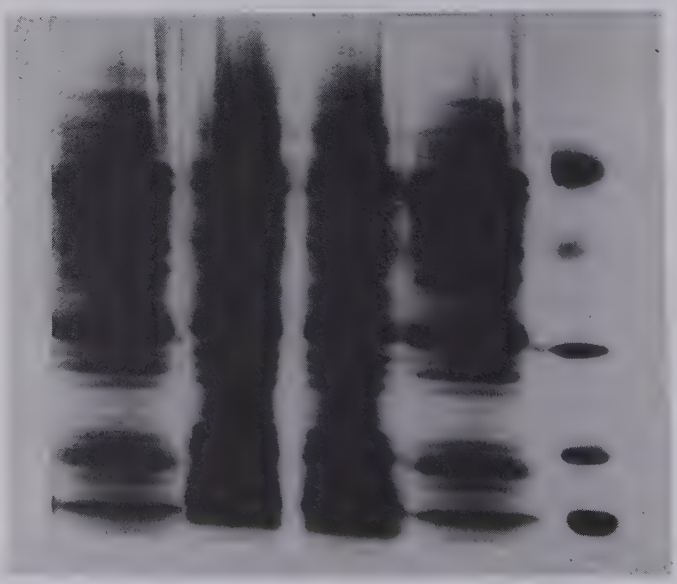


Abb. 16. Proteinmuster der Mitochondrien aller vier untersuchten Oenotherenformen. Es handelt sich dabei um die Oenothera berteriana (B·l) mit bert. Cytopl. und bert. Plst., die Oenotherenform B·l mit od. Cytopl. und bert. Plst., die B·I mit od. Cytopl. und od. Plst. sowie um die B·I mit bert. Cytopl. und bert. Plst.
Die Auftrennung erfolgte in einem 10 - 15 % PAA-Gel. Die Unterschiede und Konstanz sind gut zu erkennen.

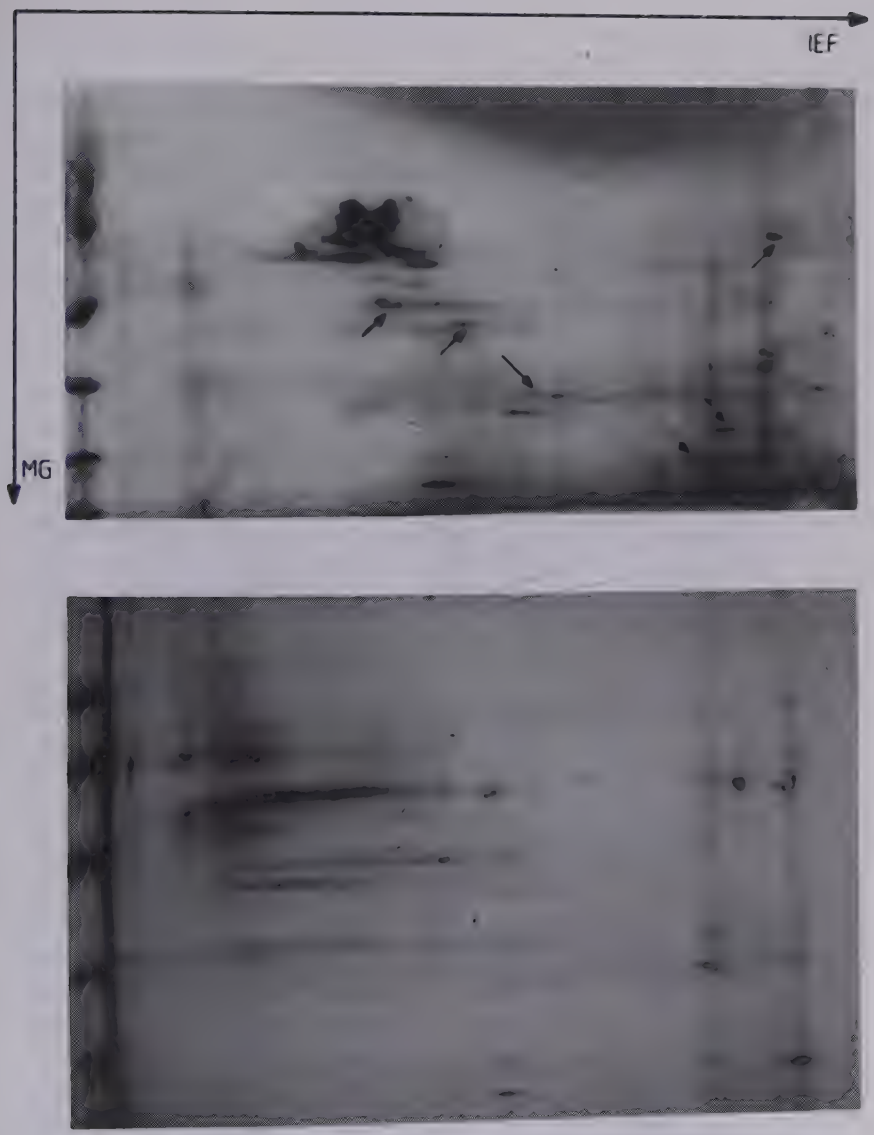


Abb. 17. Vergleich der Proteinmuster der Mitochondrien der Oenothera berteriana (B·1) mit bert. Cytopl. und bert. Plst. mit der Oenotherenform B·1 mit od. Cytopl. und bert. Plst. (unten) durch zweidimensionale SDS-PAGE. An den durch Pfeile gekennzeichneten Stellen sind die Unterschiede besonders deutlich.

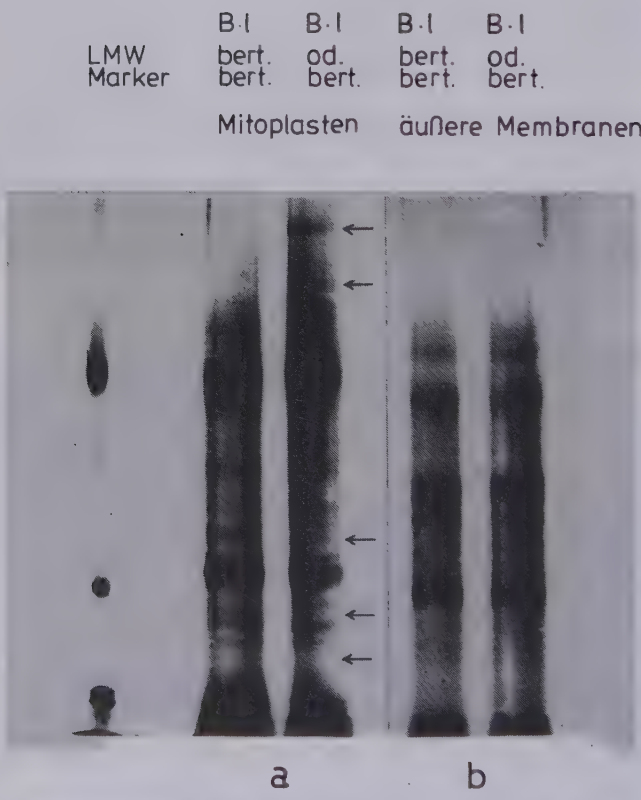


Abb. 18. Proteinmuster der Mitoplasten (18 a) und der äußeren Membranen (18 b) der Oenothera berteriana (B·l) mit bert. Cytopl. und bert. Plst. und der Oenotherenform B·l mit od. Cytopl. und bert. Plst. Die Unterschiede im Proteinmuster der Mitoplasten sind durch Pfeile gekennzeichnet, die äußeren Membranen weisen identische Proteinmuster auf.

IV. Diskussion

Um die in der Einleitung aufgeworfenen Fragen zu beantworten, war es nötig, mitochondriale DNA aus Blättern von Oenothera zu gewinnen. Dazu wurden Änderungen der in der Literatur angegebenen Methodik (SUYAMA und BONNER 1965, KOLODNER und TEWARI 1972, FONTARNAU und HERNANDEZ-YAGO 1982) vorgenommen, die geringeren Aufwand mit guten Präparationsergebnissen verbinden.

Dazu läßt sich feststellen, daß im Gegensatz zu früheren Angaben (KOLODNER und TEWARI 1972, LEBACQ und VEDEL 1981, FONTARNAU und HERNANDEZ-YAGO 1982) die Verwendung von 25 % SDS zur Lyse der Mitochondrien unter gleichzeitigem Verzicht auf Proteinase-Behandlung sowie die Verwendung nur eines CsCl-Gleichgewichtsgradienten mit verlängerter Laufzeit eine gute Reinigung der mtDNA ergibt; dies läßt sich auch dadurch belegen, daß nur von Proteinen befreite DNA von Restriktionsenzymen gespalten werden kann (s. auch ALT 1980).

Es ist gelungen, die Methode zur Isolierung von mtDNA aus Blättern von Oenothera stets reproduzierbar anzuwenden. Dies ist für die Aussagekraft der physikalischen Parameter von Wichtigkeit, außerdem ist die Reproduzierbarkeit einer Methode gerade für vergleichende Paralleluntersuchungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurden, unabdingbar.

Zunächst mußte die präparierte DNA als mtDNA identifiziert werden. Als Kriterium dafür kann die Schwebedichte dieser DNA gelten: ca. 20 % der DNA haben eine Schwebedichte von 1,703 g/cm³, während 80 % der gereinigten DNA bei einer Schwebedichte von 1,71 g/cm³ im CsCl-Gradienten banden. Bei nicht DNAse-behandelten Mitochondrien findet sich außerdem noch eine schwache Bande mit einer Schwebedichte von 1,698 g/cm³. Wie HERMANN et al. (1975), BRENNICKE (1979) und ALT (1980) gezeigt haben, entsprechen die Banden mit den Schwebedichten von 1,703 g/cm³ bzw. 1,698 g/cm³ der Kern- bzw. Plastiden-DNA der auch hier verwendeten Oenotheren. Die für die Restriktionsanalysen isolierte DNA läßt sich also als mtDNA mit ca. 20 % Anteil an Kern-DNA identifizieren (s. auch BRENNICKE 1979).

Diese 20 % Kern-DNA beeinträchtigen aber das Restriktionsmuster der mtDNA und damit die Auswertung nicht, da die Kern-DNA aufgrund ihrer Komplexität und Größe bei der restriktionsenzymatischen Behandlung in eine sehr große Anzahl von Fragmenten geschnitten wird, die sich in der Elektrophorese nicht mehr trennen lassen und so zum etwas nebligen Hintergrund bei vielen Gelen werden.

Die Schwebedichte der mtDNA von Oenothera ist mit 1,71 g/cm³ eine der höchsten, die bisher bei höheren Pflanzen gefunden wurde (KOLODNER und TEWARI 1972, QUETIER und VEDEL 1977, LEAVER und GRAY 1982).

Die Gesamtlänge des mitochondrialen Genoms von Oenothera liegt mit 210 Kilobasen (Kb) an der Obergrenze des von BRENNICKE (1979) an mtDNA aus Gewebekulturen von Oenothera gefundenen Wertes; ein Vergleich mit der mtDNA anderer höherer Pflanzen zeigt, daß die mtDNA von Oenothera damit im Bereich anderer Präparationen liegt (LEBACQ und VEDEL 1981, LEAVER und GRAY 1982).

Dabei hat es sich bei neueren Untersuchungen (BRENNICKE und BLANZ 1982) gezeigt, daß entgegen ersten Annahmen (BRENNICKE 1979) die mtDNA von Oenothera aus zirkulären Molekülen von unterschiedlicher Größe besteht, die untereinander nur geringe Homologien aufweisen. Das bedeutet, daß das mitochondriale Genom von Oenothera auf diese verschieden großen DNA-Moleküle verteilt ist und die größeren Ringe nicht einfach Oligo- und Polymere einer kleinsten Untereinheit sind. (Ähnliche Verhältnisse wurden auch bei Sojabohnen von SYNENKI et al. (1978) gefunden.) Diese intermolekular heterogene Population von Molekülen unterschiedlicher Größe stellt auch die Erklärung für die relativ große Anzahl an Restriktionsfragmenten der mtDNA aus Oenothera dar.

Die Restriktionsanalyse der mtDNA aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata mit den gleichen Restriktionsenzymen weist keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtlänge der beiden Mitochondriome auf.

Bei den vergleichenden Untersuchungen wird deutlich, daß die von ihrer Kreuzungsherkunft und durch morphologische und physiologische Ergebnisse als berteriana-Typ charakterisierten Mitochondrien untereinander identische Spaltmuster ihrer mtDNA aufweisen; dasselbe gilt für die mtDNA der Mitochondrien vom odorata-Typ.

Damit ist bewiesen, daß die Chondriome der jeweiligen Mitochondrien unabhängig von den mit ihnen kombinierten Chromosomen-Komplexen und Plastomen untereinander identisch sind und sich auch über längere Zeiträume in unterschiedlichen Umgebungen nicht verändert haben. Außerdem werden die kreuzungsgenetischen Analysen, die diese jeweiligen Mitochondrien-Typen postulierten (SCHWEMMLE, J. 1938), durch diese Ergebnisse bestätigt.

Morphologische und physiologische Ergebnisse und Diskussionen zur Konstanz und dem gerichteten Einfluß des extrachromosomalen Erbgutes aus früheren Arbeiten (z. B. SCHWEMMLE, B. 1962, FREY und SCHWEMMLE 1967, BENZ 1979) lassen sich auf diesem Hintergrund nun durch den direkten Nachweis am Erbmaterial ohne biochemische Umwege auf eine molekulare Grundlage stellen.

In den weiteren Versuchen wurde gezeigt, daß die mtDNA aus Blättern und Gewebekulturen der gleichen Oenotherenform identisch sind. Das gilt für beide Mitochondrien-Typen.
Damit wurden zwei wichtige Fragen geklärt:
Erstens ist jetzt bewiesen, daß - zumindest bei Mitochondrien - die genetischen Verhältnisse der Gewebekulturen denen der Oenotherenpflanzen, aus den die Kalli gezogen wurden, entsprechen. Die Konstanz setzt sich also auch in dieser Hinsicht fort. Damit ist evident, daß sich die Ergebnisse aus Untersuchungen an Mitochondrien von Gewebekulturen auch auf die Mitochondrien der Ausgangspflanzen ausweiten lassen.

Zweitens ist jetzt sicher, daß sich die mtDNA der Gewebekulturen von Oenothera während den 10 Jahren ihrer Anzucht nicht verändert hat. Dies ist ein weiterer Beweis für die Konstanz und Identität der mtDNA.

Außerdem können Abweichungen der mtDNA von ihrer Ausgangskonstitution mit Hilfe dieser Methode durch routinemäßige Untersuchungen rasch erfaßt werden.

Beim Vergleich der Spaltmuster der beiden Mitochondrien-Typen treten bei allen eingesetzten Restriktionsenzymen deutliche Unterschiede auf.

Dies trifft sowohl auf die mtDNA der beiden Elternformen Oenothera berteriana und Oenothera odorata (Prot.Nr. 1 und 3) als auch auf die zwei weiteren untersuchten reziproken Bastardpaare (Prot.Nr. 8 und 9, 11 und 12) zu (zur genetischen Konstitution dieser Formen s. Tab. 1). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß die mtDNAs der beiden Mitochondrien-Typen zwei voneinander unterscheidbare DNA-Moleküle bzw. -populationen sind. Auch hier läßt sich zeigen, daß die aus früheren morphologischen und physiologischen Versuchen postulierte Konstanz und Gerichtetheit des Chondrioms seine Entsprechung und Grundlage in den molekulargenetischen Verhältnissen hat. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen über die Organisation der mtDNA lassen sich vor allem zwei Möglichkeiten der Unterschiedlichkeit vorstellen:

1. Jeder Mitochondrien-Typ besitzt alle Klassen der zirkulären DNA, aber innerhalb eines oder mehrerer Ringe haben Umstellungen einzelner Teile stattgefunden.
2. Dem einen Mitochondrien-Typ fehlt einer oder mehrere Teile eines bzw. mehrerer Ringe, evtl. sogar ein ganzer Ring.

Über die Ursachen für diese Unterschiede kann bisher nur spekuliert werden, als Möglichkeiten kämen z. B. Mutationen durch Transposon-Einwirkungen in Frage.

Hier sei noch die Möglichkeit angeführt, mit Hilfe der Restriktionsanalyse der mtDNA taxonomische Untersuchungen durchzuführen. Aufgrund ihrer geringen Komplexität und Überschaubarkeit ist die mtDNA gut dazu geeignet, verwandtschaftliche Untersuchungen durchzuführen und so mit geringem Aufwand systematische Ergebnisse zu überprüfen bzw. zu ergänzen.

Dies bietet sich für Untersuchungen zur Systematik der Oenotheren an; die hier dargestellten Ergebnisse zur Konstanz und Unterschiedlichkeit der mtDNA von Oenothera berteriana und Oenothera odorata stehen am Anfang von Untersuchungen in dieser Richtung. Untersuchungen zur Taxonomie mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse von mtDNA wurden u. a. bereits von LEBACQ und VEDEL (1981), CUMMINGS et al. (1979) und COSTAS et al. (1983) durchgeführt. Allerdings konnte diese Fragestellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht weiterverfolgt werden.

Die hier diskutierten Ergebnisse der Untersuchungen der mtDNA von Oenotheren entsprechen den von ALT (1980) für die Chloroplasten-DNA von Oenotheren dargestellten Ergebnissen.

Ausgehend von dieser Grundlage war es jetzt notwendig zu untersuchen, ob und wie die Unterschiede innerhalb des Chondrioms bzw. des Plastoms auf der physiologisch wirksamen Ebene der Proteine, d. h. also vor allem der Enzyme, auftreten und sich auswirken. Erste Versuche in diese Richtung wurden von ALT (1980) durch die Untersuchung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus Plastiden von Oenotheren unternommen, in der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und wie sich die Unterschiede bzw. die Konstanz der mtDNA von Oenotheren auf Proteinebene widerspiegelt.

Die Untersuchungen der mitochondrialen Proteine haben bewiesen, daß die Ergebnisse der Restriktionsanalyse der mtDNA auf der Ebene der Proteine ihre Analogie finden: Das Proteinmuster der bert.-Mitochondrien (Prot.Nr. 1 und 8) zeigt untereinander genaue Übereinstimmung , auch bei den Proteinen der odorata-Mitochondrien (Prot.Nr. 2 und 9) ist völlige Deckung im Proteinmuster zu erkennen (zur genetischen Konstitution dieser Formen s. Tab. 2).

Dieses Ergebnis ist - im Gegensatz zur genetischen Konstanz der mtDNA - nicht unbedingt zu erwarten: Da die mitochondrialen Proteine sowohl vom Kerngenom als auch vom Mitochondriom selber codiert werden, wären Unterschiede im Proteinmuster von Mitochondrien des gleichen Typs, die aber unterschiedliches Kerngenom besitzen, nicht überraschend.

Auch beim Vergleich der Proteinmuster der bert.-Mitochondrien mit den od.-Mitochondrien können mit der mtDNA übereinstimmende Ergebnisse festgestellt werden. Da diese Unterschiede aufgrund der genetischen Konstitution der verwendeten Versuchspflanzen mitochondrial codiert sein müssen, ist damit bewiesen, daß die Unterschiede der beiden mtDNAs auf codierende Sequenzen zurückzuführen sind und daß die beiden unterschiedlichen DNA-Moleküle auch unterschiedliche Proteinausstattungen nach sich ziehen.

Dies bedeutet eine wichtige Verbindung zwischen bisherigen morphologischen und physiologischen Beobachtungen (SCHWEMMLE, B. 1962, FREY und SCHWEMMLE 1967, BENZ 1979) und den direkten Untersuchungen der mitochondrialen DNA dieser Oenotheren. Durch die Ergebnisse von HACHTEL (1977) und ALT (1980) konnte dies für Chloroplasten von Oenothera berteriana und Oenothera odorata bereits nachgewiesen werden: Nachdem HACHTEL (1977) Unterschiede in der Proteinzusammensetzung von Chloroplastenmembranen aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata zeigen konnte, für die er aufgrund des Erbganges eine plastidiale Codierung forderte, bewies ALT (1980), daß in den Plastiden dieser Oenotheren tatsächlich zwei unterschiedliche cp-DNA-Moleküle existieren. Ähnliche Folgerungen konnten z. B. aus Untersuchungen über die mt-codierte männliche Sterilität bei Mais gezogen werden (LEVINGS 1979, PRING et al. 1977, DIANO 1982).

Bei der Untersuchung des Proteinmusters der äußeren Membranen und der Mitoplasten konnte gezeigt werden, daß Unterschiede im Proteinmuster ausschließlich im Mitoplasten auftreten, während die äußeren Membranen - im untersuchten Fall identische - Proteinmuster entsprechend der Konstitution des Kerngenoms aufweisen. Damit kann als sicher angenommen werden, daß die äußere Membran bei vergleichenden Untersuchungen von Formen mit gleichem Kerngenom keinen Einfluß auf auftretende Unterschiede ausübt.

Dieses Ergebnis stimmt gut mit den von BENZ (1979) an Mitoplasten und äußeren Membranen von Oenotheren-Mitochondrien gewonnenen Ergebnissen zur Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung überein. Auch hier treten Unterschiede nur im Mitoplasten auf, während sich die äußeren Membranen identisch verhalten.

Da bekannt ist (HATEFI et al. 1976, BOSCHETTI 1978), wie wichtig die Assoziation Proteine - Lipide gerade für die Funktion der Enzyme der Atmungskette ist, erhärtet die Kombination dieser Ergebnisse die Erklärung für unterschiedliche physiologische Leistungen der beiden Mitochondrien-Typen: Sowohl Protein- als auch in geringem Maße die Fettsäuresynthese sind teilweise vom mitochondrieneigenenen Transcriptions- und Translationssystem abhängig. Unterschiedliche mtDNAs ergeben somit unterschiedliche Mitoplastenzusammensetzungen und -leistungen.

Im Rahmen der Auswertung der Proteinuntersuchungen wurden nun die Molekulargewichte (MG) der auftretenden Proteinbanden bestimmt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Proteine bzw. -untereinheiten gelegt, die nur bei einem Mitochondrien-Typ (bert. oder od.) auftraten (s. III.B.2). Wie bereits oben erwähnt, müssen diese Proteine aufgrund der genetischen Konstitution der verwendeten Versuchspflanzen und aufgrund des Nachweises der Konstanz unter den jeweiligen Mitochondrien-Typen mitochondrial codiert sein. Dabei fällt auf, daß diese nur bei einem Mitochondrien-Typ auftretenden Proteine mit ihren MGs z. T. ganz genau mit den MGs der mt-codierten Proteine übereinstimmen, die ATTARDI und CHING (1979) aus HeLa-Zellen-Mitochondrien elektrophoretisch darstellten.

Vergleicht man nun die MGs der nur bei jeweils einem Mitochondrien-Typ auftretenden Proteine mit vielen Angaben in der Literatur (KOCH 1976, DE JONG et al. 1980, SCHATZ und MASON 1974, Übersicht bei HATEFI et al. 1979), so lassen sich folgende Überlegungen anstellen: Bei den Proteinen mit den MGs 27 000 bzw. 28 500 könnte es sich um zwei leicht unterschied-

liche Monomere des Cytochrom b handeln, während das 25 600-MG-Protein evtl. als subunit II der Cytochrom-c-Oxidase (CCO) in Frage käme. Das 10 900-MG-Protein entspricht der ATPase-subunit 9, das 18 300-MG-Protein evtl. ihrer subunit 4. Das Protein mit dem MG von 35 000 wäre als subunit I der CCO den denkbar. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß diese Überlegungen nur als Vermutungen, aber nicht als gesicherte Ergebnisse anzusehen sind. Sicherheit können hier nur Untersuchungen erbringen, die die isolierten einzelnen Proteine mit immunologischen Methoden identifizieren. Die vorliegende Arbeit hatte jedoch das Ziel, die Beschaffenheit der mtDNA und ihrer sekundären Produkte, der Proteine, vergleichend zu untersuchen, um zunächst Aussagen darüber machen zu können, ob der Unterschied bzw. die Konstanz der mtDNA sich in den Proteinen widerspiegelt. Aus zeitlichen und methodischen Gründen war es daher nicht möglich, die oben genannten Proteine näher zu untersuchen oder gar zu identifizieren. Allerdings sind die Ergebnisse der Proteinauftrennung und die Bestimmung der MGs der unterschiedlichen Proteine wichtige Grundlagen und Hinweise für weitere Untersuchungen.

In der Kombination der vorliegenden Ergebnisse ergibt sich nun folgendes Bild: Es ist nun bewiesen, daß die Oenothera berteriana und die Oenothera odorata zwei voneinander unterscheidbare mtDNA-Moleküle besitzen, die Mitochondrien mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung hervorbringen. Auf diesem Hintergrund lassen sich habituelle und physiologische Einflüsse des Mitochondrioms, wie sie von verschiedenen Autoren gefordert wurden (SCHWEMMLE, B. 1962, auf die photoperiodische Blühreaktion; FREY und SCHWEMMLE, B. 1967, auf die circadiane Rhythmik; OTTMAR 1979, auf die spezifische Aktivität von Atmungskettenenzymen; BENZ 1979, auf die Phospholipidzusammensetzung isolierter Mitochondrien) erklären.

BENZ (1979) stellte für den gerichteten Einfluß der mtDNA die Hypothese auf, daß in die Atmungskette der od.-Mitochondrien pro Membransegment mehr Proteine eingebaut werden als bei den bert.-Mitochondrien. Aufgrund der vorliegenden Ergeb-

nisse ist diese Möglichkeit zwar nicht auszuschließen, als wahrscheinlicher ist aber die Tatsache anzusehen, daß Untereinheiten bestimmter Atmungskettenenzyme bei den beiden Mitochondrien-Typen entweder in unterschiedlicher Form vorliegen oder daß sie ganz fehlen bzw. zusätzliche existieren. Diese Annahme ist durchaus nicht abwegig, wenn man in Erwägung zieht, daß Untersuchungen der Cytochrom-c-Oxidase und der mtATPase aus verschiedenen Organismen (Zusammenfassung bei HATEFI et al. 1979) ergaben, daß diese Schlüsselenzyme je nach Organismus aus verschieden vielen Untereinheiten bestehen können.

Die Erklärung der gerichteten Wirkung der mtDNA von Oenothera berteriana und Oenothera odorata auf die Phospholipid- und Proteinzusammensetzung ihrer Mitochondrien und auf an diese Mitochondrien gebundene physiologische Vorgänge (wie z. B. deutliche Unterschiede in den Atmungsaktivitäten , BENZ 1979, und signifikante Aktivitätsunterschiede bei Atmungskettenenzymen, OTTMAR 1979) erscheint durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als schlüssig; über die Beeinflussung von physiologischen Vorgängen außerhalb der Mitochondrien, wie z. B. der photoperiodischen Blühreaktion (SCHWEMMLE, B. 1962), die lichtinduzierte Aktivitätssteigerung der L-Phenyl-alanin-ammonium-Lyase (HACHTEL 1972) u. a. m. kann bisher nur wenig gesagt werden.

So fanden DUJARDIN et al. (1980) bei Untersuchungen an Mutanten von Saccharomyces cerevisiae sowohl Allel- als auch Gen-spezifische Suppressoren. Physiologische Suppressoren werden von RUIZ und KNOWLES (1980) für Cytochrom aa_3defekt-Mutanten von Paramecium vermutet.

Diese Suppressoren beeinflussen die Transcription bzw. die Translation oder den Stoffwechselweg von Translationsprodukten. Für diese Vorgänge werden Kontroll-Gene des Kerns bzw. der Mitochondrien diskutiert, die innerhalb der Organellen und/oder zwischen den Organellen agieren. Ähnliche Abläufe könnten auch bei den Mitochondrien (und Plastiden) der Oe-

notheren vorstellbar sein: So wäre es durchaus denkbar, daß ein mt-codiertes Protein nicht in die Atmungskette eingebaut wird, sondern aus dem Mitochondrium ausgeschleust wird und durch Einfluß auf bestimmte Stoffwechselvorgänge zu den dargestellten habituellen und physiologischen Unterschieden führt. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, daß das Protein auch innerhalb der mtDNA bzw. während der Transcription und Translation im Mitochondrium regulierend einwirkt.

Schließlich ist noch die Möglichkeit zu diskutieren, daß der gerichtete Einfluß der mtDNA nicht durch direkt wirkende Suppressoren stattfindet, sondern daß z. B. durch unterschiedliche Aktivitäten bestimmter Schlüsselenzyme (z. B. der Succinatdehydrogenase, OTTMAR 1979, die im Mitochondrium an einem zentralen Punkt des Stoffwechsels lokalisiert ist) oder durch unterschiedliche Phosphorylierungsraten (BENZ 1979) ein Sekundäreffekt erzielt wird, der als Signal für bestimmte Stoffwechselwege oder z. B. für das Phytochromsystem, mit dem ja einige der beobachteten Unterschiede direkt zusammenhängen (CHRISTNER 1973, HACHTEL 1972, HACHTEL und SCHWEMMLE 1972) dient. Durchaus denkbar wäre natürlich auch eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten.

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zunächst mit der Ausarbeitung einer Methode zur Isolierung von mtDNA aus Blättern von Oenothera. Diese mtDNA wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen vergleichend untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Mitochondrien der Oenotheren in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung ebenfalls vergleichend untersucht.

Als Hauptergebnisse sind hervorzuheben:

- Die Methode zur Isolierung von mtDNA aus Blättern von Oenothera wurde ausgearbeitet (Flußdiagramm 1 und II.A.4.).

- Die Schwebedichte der präparierten mtDNA liegt bei 1,710 g/cm³, das mt-Genom hat eine Gesamtlänge von 210 Kb (Tab. 3).

- Die Restriktionsanalyse der mtDNA aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata mit den Enzymen Eco R I, Bam H I und Hind III zeigt deutliche Unterschiede der beiden Chondriome. Diese Unterschiede treten auch dann auf, wenn die mtDNA in Kombination mit verschiedenen Chromosomen-Komplexen und Plastomen untersucht wird (Abb. 7, 8 und 9).

- Die mtDNA des jeweils gleichen Mitochondrien-Typs (sowohl die bert.- als auch die od.-Mitochondrien unter sich) weist unabhängig von der Kombination mit verschiedenen Chromosomen-Komplexen und Plastomen immer ein identisches Restriktionsmuster auf (s. Abb. 3 und 4). Das heißt, daß sich die mtDNA der Oenotheren weder unter dem Einfluß eines fremden Kerns noch unter dem Einfluß eines fremden Plasmons verändert hat.

- Die mtDNA aus Gewebekulturen und aus Blättern der gleichen Oenotherenform ist identisch (Abb. 5). Das bedeutet, daß sich die mtDNA der Gewebekulturen auch nach 10 Jahren Anzucht nicht verändert hat.

- In der Proteinzusammensetzung zeigen die Mitochondrien der Oenothera berteriana und der Oenothera odorata deutliche Unterschiede (s. Abb. 15, 16 und 17), wogegen die Mitochondrien des bert.-Typs untereinander identische Proteinzusammensetzun-

gen aufweisen (Abb. 13); eine Tatsache, die auch für die Mitochondrien des od.-Typs zutrifft (Abb. 14).

- Die äußeren Membranen weisen unabhängig vom Mitochondrien-Typ bei gleichem Kerngenom identische Proteinzusammensetzungen auf, während die Mitoplasten beider Typen im direkten Vergleich Unterschiede im Proteinmuster aufweisen (Abb. 18).

- Die verschiedenen mtDNA-Moleküle der Oenothera berteriana und der Oenothera odorata codieren also für z. T. unterschiedliche Proteine. Die mögliche Funktion dieser Proteine als mitochondriale Enzyme und als Suppressoren, die in Wechselwirkung mit der Kern-DNA stehen können, wird diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

ALT, J. (1980): Untersuchungen zur Konstanz des Plasmons und über die DNA-abhängige RNA-Polymerase der Plastiden von genetisch bekannten Oenotheren. Dissertation Tübingen

ALT, J., HACHTEL, W. und SCHWEMMLE, B. (1982): Vererbung der Chloroplasten-DNA bei Munzia-Oenotheren. Berichte der dt. bot. Gesellschaft 95, 281-289

ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., DE BRUIJN, M.H.L., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J.H., STADEN, R. und YOUNG, I.G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457-465

ATTARDI, G. und CHING, E. (1979): Biogenesis of mitochondrial proteins in HeLa Cells. Meth. in Enzym. LVI, 66-79

BAUR, E. (1909): Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "varietas albumarginatae hort" von Pelargonium zonale. Z. Vererbungslehre 1, 330-351

BENZ, R.(1979): Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien und die Phospholipidzusammensetzung ihrer Membranen (vergleichende Untersuchungen bei Oenotheren bekannter genetischer Konstitution). Dissertation Tübingen

BOSCHETTI, A. (1978): Biogenese der Chloroplasten und Mitochondrien. G. Fischer, Stuttgart

BRENNICKE, A. (1979): Untersuchung der mtDNA von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution. Dissertation Tübingen

BRENNICKE, A. (1980): Mitochondrial DNA from Oenothera berteriana. Plant Physiol. 65, 1207-1210

BRENNICKE, A. und BLANZ, P. (1982): Circular mtDNA species from Oenothera with unique sequences. Molec. gen. Genet. 187, 461-466

BRENNICKE,A. und SCHWEMMLE,B.: Inheritance of mitochondrial DNA in Oenothera berteriana and Oenothera odorata hybrids. Zum Druck eingereicht

CABRAL, F. und SCHATZ, G. (1979): High resolution one- and two-dimensional electrophoretic analysis of mitochondrial membrane polypeptides. Meth. in Enzymol. LVI, 602-613

CHRISTNER, J. (1973): Der Einfluß des Plasmotypus auf die Flavonoidsynthese (Untersuchungen an Raimannia-Oenotheren). Dissertation Tübingen

CHUN, E.H.L., VAUGHAN, M.H. und RICH, A. (1963): The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. J. Molec. Biol. 7, 130-141

CLELAND, R.E. (1972): Oenothera. Acad. Press Inc., London

CORRENS, C. (1909): Vererbungslehre mit blass(gelb)grünen und buntblättrigen Sippen bei Mirabilis, Urtica und Lunaria. Z. Vererbungslehre 1, 291-329

COSTAS, M., EDWARDS, S.W., LLOYD, D., GRIFFITHS, A.J. und TURNER, G. (1983): Restriction enzyme analysis of mtDNA of members of the genus Acanthamoeba as an aid in taxonomy. FEMS Microbiology Letters 17, 231-234

DE JONG, L., HOLTROP, M. und KROON, A.M. (1980): The biogenesis of rat liver ATPase. Two subunits are synthesized inside the mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 608, 32-38

DIANO, M. (1982): Electrophoretic comparison of mitochondrial polypeptides from maize lines susceptible and resistant to Helminthosporium maydis race T. Plant Physiol. 69, 1217-1221

DIETRICH, W. (1977): The South American species of Oenothera sect. Oenothera (Raimannia, Renneria, Onagraceae). Annals of the Missouri Botanical Garden 64/3, 425-626

DUJARDIN, G., PAJOT, P., GRANDINSKY, D. und SLONIMSKI, P.P. (1980): Long range control circuits within mitochondria and between nucleus and mitochondria. Molec. gen. Genet. 179, 469-482

EICHER, K. (1982): Restriktionsanalytische Untersuchung der mtDNA von Oenothera odorata und Oenothera berteriana sowie zweier reziproker Bastarde. Staatsexamensarbeit Tübingen

FONTARNAU, A. und HERNANDEZ-YAGO, J. (1982): Characterization of mtDNA in Citrus. Plant Physiol. 70, 1678-1682

FREY, H.D. und SCHWEMMLE, B. (1967): Zur genetischen Analyse der circadianen Rhythmik bei höheren Pflanzen. Nachr. der Akad. der Wissenschaften, Göttingen 10, 106-107

HACHTEL, W. (1972): Der Einfluß des Plasmotypus auf die Regulation der Aktivität der L-Phenyl-alanin-Ammonium-Lyase (Untersuchungen an Raimannia-Oenotheren). Planta 102, 247-260

HACHTEL, W. (1977): Dependency of cp-membrane proteins on both nuclear and cp-DNA in some Oenothera species. Biochem. Physiol. der Pflanzen 171, 75-83

HACHTEL, W. und SCHWEMMLE, B. (1972): Zur Beteiligung des Plasmons an der Regulation der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Z. Pflanzenphysiologie 68, 127-133

HAGEMANN, R. (1964): Plasmatische Vererbung. VEB G. Fischer, Jena

HATEFI, Y., GALANTE, Y.M., STIGALL, D.L. und DJAVADI-OHANIANCE, L. (1976): Recent advances on the chemistry of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. In: The structural basis of membrane function. (Hatefi, Y. und Djavadi-Ohaniance,L. eds.) Acad. Press, New York, 169-188

HATEFI, Y., GALANTE, Y.M., STIGALL, D.L. und RAGAN, C.J. (1979): Proteins, polypeptides, prosthetic groups and enzymic properties of complex I, II, III, IV and V of the mitochondrial phosphorylation system. Meth. of Enzym. LVI, 577-602

HERRMANN, R.G., BOHNERT, H.J., KOWALLIK, K.V. und SCHMITT, J.M. (1975): Size, conformation and purity of cpDNA of some higher plants. Biochim. Biophys. Acta 378, 305-317

JINKS, J.L. (1967): Extrachromosomale Vererbung. G. Fischer, Stuttgart

KOCH, G. (1976): Synthesis of the mitochondrial inner membrane in cultured Xenopus laevis oocytes. J. Biol. Chem. 251(19), 6097-6107

KOLODNER, R. und TEWARI, K.K. (1972): Physicochemical characterization of mtDNA from pea leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1830-1834

LAEMMLI, U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

LANGEWELLPOTT, D. (1970): Über den Einfluß von Geno- und Plasmotypus auf die phytochromgesteuerte Samenkeimung und die Chlorophyllsynthese. Staatsexamensarbeit Tübingen

LEAVER, C.J. und GRAY, M.W. (1982): Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 373-402

LEBACQ, P. und VEDEL, F. (1981): SAL I restriction enzyme analysis of cpDNA and mtDNA in the genus Brassica. Plant Sci. Lett. 23, 1-9

LEVINGS, C.S. III und PRING, D.R. (1979): MtDNA of higher plants and genetic engineering. (Vol. 1) Setlow, J.K. und Hollaender, A. (eds.), Plenum Press, New York and London

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.R., FARR, H.L. und RANDALL, J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

LUCK, D.J.L. und REICH, E. (1964): DNA in mitochondria of Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 931-938

MICHAELIS, P. (1962): Über Zahlengesetzmäßigkeiten plasmatischer Erbträger, insbesondere der Plastiden. (Sammelreferat) Protoplasma 55, 177-231

NITSCH, J. und NITSCH, C. (1969): Haploid plants from pollen grains. Science 163, 85-87

O'FARRELL, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021

O'FARRELL, P.Z., GOODMAN, H.M. und O'FARRELL, P.H. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well acidic proteins. Cell 12, 1133-1142

OTTMAR, C. (1979): Untersuchungen über die spezifische Aktivität von Mitochondrienenzymen bei zwei genetisch bekannten Oenotheren-Formen. Staatsexamensarbeit Tübingen

PRING, D.R., LEVINGS, C.S. III, HU, W.L. und TIMOTHY, D.H. (1977): Unique DNA associated with mitochondria in the S-type cytoplasm of male-sterile maize. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2904-2908

QUETIER, F. und VEDEL, F. (1977): Heterogenous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. Nature 268, 365-368

RUIZ, F. und KNOWLES, J. (1980): Genetic interactions in the control of mitochondrial function in Paramecium. II. Interaction between nuclear and mitochondrial genes. Molec. gen. Genet. 180, 563-572

SCHATZ, G. und MASON, T.L. (1974): The biosynthesis of mitochondrial proteins. Ann. Rev. Biochem. 43, 51-87

SCHWEMMLE, B. (1962): Über den Einfluß von Kern, Plasma und Plastiden auf die photoperiodische Reaktion einiger Raimannia-Oenotheren. Planta 58, 619-646

SCHWEMMLE, J. (1938): Genetische und zytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren I. Die Analyse der Oe. bert. und Oe. od. Z. Vererbungslehre 75, 358-368

SCHWEMMLER, W. (1977): Die Zelle: Elementarorganismus oder Endosymbiose. Biol. in unserer Zeit 7, 7-14

SUYAMA, Y. und BONNER, W.D. (1965): DNA from plant mitochondria. Plant Physiol. 41, 383-388

SYNENKI, R.M., LEVINGS, C.S. III und SHAH, D.M. (1978): Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from Soybean. Plant Physiol. 61, 460-464

VEDEL, F. und MATHIEU, L. (1982): Isolation of purified mtDNA from Brassicae. Analytical Biochem. 127, 1-8

Lebenslauf

26.09.1954	Geboren in Stuttgart, Sohn des Prof. Dr. Dietrich Ottmar und seiner Frau Liselotte , geb. Bort
1961 - 1965	Grundschule in Stuttgart-Vaihingen
1965 - 1973	Karlsgymnasium in Stuttgart
22.06.1973	Abitur
1973 - 1979	Biologie- und Sportstudium an der Universität Tübingen
1978	Staatsexamen in Sportwissenschaft
1979	Staatsexamen in Biologie
1978	Wissenschaftliche Arbeit am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle mit dem Thema: Untersuchungen über die spezifische Aktivität von Mitochondrienenzymen bei zwei genetisch bekannten Oenotheren-Formen
1979 - 1980	Zivildienst
1981 - 1983	Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. B. Schwemmle
1981 - 1983	Promotionsstipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, Begov, Bentrup, Bunke, Digel, Dobat, Drumm, Engelmann, Engels, Frey, Gabler, Göhner, Grell, Grupe, Hadeler, Hahn, Hager, Jeschke, Klein, Kulzer, Kurz, Mayer, Mickoleit, Möhres, Netzel, Oberwinkler, Rähle, Seitz, Seyffert, Schwemmle, Winkler.